ENTWICKLUNG SELEKTIVER ABSPALTUNGSREAGENZIEN FÜR ADPOC-GESCHÜTZTE AMINOSÄUREN UND PEPTIDE

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

CHARLES T. BENI
aus Nandom/Ghana

1985

ENTWICKLUNG SELEKTIVER ABSPALTUNGSREAGENZIEN FÜR ADPOC-GESCHÜTZTE AMINOSÄUREN UND PEPTIDE

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

CHARLES T. BENI
aus Nandom/Ghana

1985

Tag der mündlichen Prüfung: 6. 5. 1985

Dekan:	Professor Dr. K+A. Kovar
1. Berichterstatter:	Professor Dr. W. Voelter
2. Berichterstatter:	Professor Dr. E. Bayer

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Wolfgang Voelter in der Zeit von September 1981 bis Januar 1985 an der Abteilung für Physikalische Biochemie des Physiologisch-Chemischen Instituts der Universität Tübingen angefertigt.

An dieser Stelle gilt mein herzlichster Dank Herrn Professor Dr. Wolfgang Voelter für die Themenstellung, sein stetes Interesse und großzügige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Der Otto-Benecke Stiftung, Bonn, sei für die Verleihung eines Promotionsstipendiums herzlich gedankt.

Für Prosper

Folgende Damen und Herren bin ich zu Dank verpflichtet:

Für die Aufnahme der Spektren möchte ich Herrn Bartholomä (FD-MS) und Herrn Maier (^{13}C-NMR-Spektren) danken. Frau Bauer und Herrn Wurmstich sei für die sorgfältige Durchführung der Elementaranalysen gedankt.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
2.	ALLGEMEINER TEIL	2
2.1.	Schutzgruppen	2
2.1.1.	Aminoschutzgruppen	3
3.	LITERATURÜBERSICHT ZUR ABSPALTUNG VON SCHUTZGRUPPEN	4
3.1.	Abspaltung mit Natrium in flüssigem Ammoniak	4
3.2.	Abspaltung mit Fluorwasserstoff	4
3.3.	Abspaltung mit Trifluoressigsäure	5
3.4.	Bisherige kinetische Untersuchungen zur Abspaltung von N-Schutzgruppen	6
4.	SPEZIELLER TEIL	10
4.1.	Themenstellung	10
4.2.	Zur Synthese der Modellverbindungen	10
4.2.1.	Synthese der Ausgangsverbindungen und Einführungsreagenzien	12
4.2.1.1.	Adpoc-fluorid (Adpoc-F)	14
4.2.1.2.	Darstellung der Adpoc-Aminosäuren	15
4.2.1.2.1.	^{13}C-NMR-Spektroskopie von Adpoc-Aminosäuren	15
4.2.2.	Synthese von Adpoc-Trp-Lys(Boc)-OH	19
4.2.3.	Synthese von Adpoc-Leu-Trp-OMe	19
4.2.4.	Synthese von Adpoc-Leu-Trp-Met-OH	22
4.2.5.	Synthese von Adpoc-Leu-Pro-OMe	26

5.	ZUR KINETIK	28
5.1.	Allgemein	28
5.2.	Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten	28
5.3.	Abspaltungsmechanismus	29
5.4.	Bestimmung der Spaltungsgeschwindigkeit durch HPLC	31
5.5.	Suche nach geeigneten Abspaltungsreagenzien	32
5.5.1.	Selektive Abspaltung der säurelabilen Adpoc-Gruppe bei Adpoc-Trp-Lys(Boc)-OH	35
5.5.2.	Abspaltung einiger Adpoc-geschützter Aminosäurederivate mit 3 % TFA/CH_2Cl_2	39
5.5.3.	Abspaltung der Adpoc-Gruppe von Adpoc-Aminosäuren aromatischer Struktur	40
5.5.4.	Abspaltung von Adpoc-Aminosäuren mit basischen funktionellen Gruppen	45
5.5.5.	Abspaltung von Adpoc-Ala-Lys(Boc)-Leu-OMe	46
5.5.6.	Abspaltung von tryptophanhaltigen Adpoc-Dipeptiden	48
5.5.7.	Abspaltung von Adpoc-Leu-Trp-Met-OH	49
5.5.8.	Kinetische Parameter der Abspaltungsversuche	51
5.6.	Zur Differentialthermoanalyse (DTA)	52
6.	EXPERIMENTELLER TEIL	61
6.1.	Spektroskopische Methoden	61
6.2.	Kernresonanzspektroskopie	61
6.3.	Massenspektrometrie	61
6.4.	Drehwerte	61
6.5.	Chromatographische Methoden	62
6.6.	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	62
6.7.	Sonstige Geräte	64
6.8.	Chemikalien	64

6.9.	Synthese der Adpoc-Aminosäure über das Fluorameisensäure-2-adamantyl(1)-propyl(2)-ester (Adpoc-F)	65
6.9.1.	Adamantancarbonsäureethylester	65
6.9.2.	Adamantancarbonsäuremethylester	65
6.9.3.	2-(1-Adamantyl)propanol-2	66
6.9.4.	Fluorameisensäure-2-(1-adamantyl)-propyl(2)-ester (Adpoc-F)	67
6.9.5.	N^{α}-[1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl]-L-leucin (Adpoc-Leu-OH)	67
6.9.6.	N^{α}-[1-(1-Adamantyl)-2-methylethoxycarbonyl]-L-leucin-N-hydroxysuccinimidester (Adpoc-Leu-OSu)	68
6.9.7.	N^{α}-[1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl]-L-leucyl-tryptophan (Adpoc-L-Leu-L-Trp-OH)	69
6.9.8.	Herstellung von Methioninmethylesterhydrochlorid (Met-OMe·HCl)	69
6.9.9.	N^{α}-[1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl]-L-leucyl-L-tryptophanyl-L-methionin-methylester (Adpoc-Leu-Trp-Met-OCH_3)	70
7.	Darstellung von L-Tryptophanmethylesterhydrochlorid (L-Trp-OMe·HCl)	71
7.1.	N^{α}-[1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl]-L-leucyl-L-tryptophanmethylester (Adpoc-Leu-Trp-OMe)	71
7.2.	N^{α}-[1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl]-L-leucyl-L-tryptophan (Adpoc-Leu-Trp-OH)	72
7.3.	N^{α}-[1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl]-L-leucyl-L-tryptophanyl-L-methionin (Adpoc-Leu-Trp-Met-OH)	72

8.	Darstellung von Phenylbenzylkohlensäure-ester	73
8.1.	Herstellung von N^{ε}-Carbobenzoxy-L-lysin (H-Lys(Z)-OH)	73
8.2.	N^{α}-[1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl]-N^{ε}-carbobenzoxy-L-lysin (Adpoc-Lys(Z)-OH)	74
9.	Herstellung von N^{ε}-Boc-Lysin (H-Lys(Boc)-OH)	74
9.1.	N^{α}-[1-(1-Adamanyl)-1-methylethoxycarbonyl]-N^{ε}-Boc-L-lysin (Adpoc-Lys(Boc)-OH)	75
9.2.	N^{α}-[1-(1-Adamanyl)-1-methylethoxycarbonyl]-1-L-tryptophan (Adpoc-Trp-OH)	76
9.2.1.	N^{α}-[1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl]-1-L-tryptophan-N-hydroxysuccinimidester (Adpoc-Trp-OSu)	77
9.2.2.	N^{α}-[1-(2-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl]-1-L-tryptophanyl-N^{ε}-Boc-lysin (Adpoc-Trp-Lys(Boc)-OH)	77
9.3.	Darstellung von Glycinethylesterhydrochlorid (Gly-OEt·HCl)	78
9.3.1.	Adpoc-Gly-OEt	78
9.4.	Darstellung von Adpoc-Leu-Pro-OMe	79
9.5.	Darstellung von Adpoc-Pro-OH	80
9.6.	Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Bestimmung der Abspaltungskinetik	80
10.	ZUSAMMENFASSUNG	82
11.	LITERATURVERZEICHNIS	84

ABKÜRZUNGEN

Folgende Abkürzungen werden verwendet:

Adpoc	1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl
Azoc	α,α-Dimethyl-4-phenylazobenzyloxycarbonyl
Boc	tert.-Butyloxycarbonyl
Bpoc	2-p-Biphenylylisopropyloxycarbonyl
Bzl	Benzylether
DCCI	Dicyclohexylcarbodiimid
DCHA	Dicyclohexylammonium
Ddz	3,5-Dimethoxy(α,α'-dimethyl)benzyloxycarbonyl
DTA	Differentialthermoanalyse
HAc	Essigsäure
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HOSu	N-Hydroxysuccinimid
LH-RH	Luteinizing hormone-releasing hormone
MeOH	Methanol
Ppoc	α,α-Dimethylbenzyloxycarbonyl
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
TFEt	Trifluorethanol
TRH	Threotropin Releasing Hormone
Z	Benzyloxycarbonyl

Die Abkürzungen für Aminosäuren entsprechen denen der IUPAC-IUB-Nomenklatur-Kommission: Eur. J. Biochem. 27, 201 (1972); 74, 1 (1977)

1. EINLEITUNG

Trotz beträchtlicher Fortschritte in der Schutzgruppenforschung zur Peptidsynthese, werden immer wieder Schutzgruppen gesucht, die unter milden acidolytischen Bedingungen im Vergleich zur tert-Butyl- und Benzyloxycarbonylgruppe [1] problemlos abspaltbar sind. Die Bpoc- [2], Ddz- [3]; Ppoc- [4] und Azoc- [5] Gruppen werden unter diesen Bedingungen abgespalten, doch finden meist nur die Bpoc- und Ddz-Gruppe in der Peptidsynthese Anwendung, da die entsprechenden geschützten Aminosäuren käuflich sind.

Der Nachteil dieser Verbindungen ist, daß sie bei Raumtemperatur und unter Lichteinwirkung instabil sind. 1978 berichteten Voelter und Mitarbeiter [6-9] über neue säurelabile Aminoschutzgruppen. Sie verwendeten die Adpoc-Gruppe zur Synthese von Somatostatin [10], TRH [11], LH-RH [12] und Teilsequenzen von Thymopoietin [13-15]. Dabei erhielten sie hohe Ausbeuten und kristalline Produkte. Die Adpoc-Gruppe hat gegenüber anderen Schutzgruppen mehrere Vorteile [10]. Beispielsweise ist die Adpoc-Gruppe tausendmal schneller abspaltbar als die Boc-Gruppe [7].

In der vorliegenden Arbeit wird die Abspaltung der Adpoc-Gruppe von Modellverbindungen kinetisch in verschiedenen Säuregemischen untersucht. Alle untersuchten Modellverbindungen werden zunächst durch klassische Methoden synthetisiert und charakterisiert.

2. ALLGEMEINER TEIL

2.1. Schutzgruppen

Schutzgruppen zur Blockierung von Funktionen, die im Verlauf der Synthese nicht an der Bildung einer Peptidbindung beteiligt sind, werden als "konstante" Schutzgruppe bezeichnet. Derartige Schutzgruppen können während des gesamten Syntheseverlaufes beibehalten oder schon von einer Zwischenstufe entfernt werden.
Es wird zwischen "intermediären" und "konstanten" Schutzgruppen unterschieden. Eine "intermediäre" Schutzgruppe hat folgende Bedingungen zu erfüllen:

a) Abspaltungsmöglichkeiten ohne Beeinträchtigung der Stabilität konstanter Schutzgruppen und der Peptidbindungen.

b) Optimale Ausschaltung der Razemisierung sowohl bei der Einführung und Abspaltung als auch während der Knüpfung der Peptidbindung.

c) Erhöhung der Stabilität und Verbesserung der Charakterisierungsmöglichkeiten der entsprechenden geschützten Zwischenprodukte.

d) Eindeutige Gewährleistung der Aktivierung der Carboxygruppe.

e) Verbesserung der Löslichkeitseigenschaften der Reaktionspartner für die Kupplungsreaktion.

Diesen genannten Kriterien werden die gegenwärtig bekannten intermediären Schutzgruppen nicht in allen gestellten Anforderung optimal gerecht.

Entsprechend der gewählten Bezeichnung werden "konstante" Schutzgruppen nach Beendigung einer Synthese abgespalten, wobei ein Angriff auf Peptidbindungen bzw. funktionelle Gruppen vermieden werden muß. Neben den verminderten Selektivitätsanforderungen gelten für die konstanten Schutzgruppen die unter c) und e) aufgeführten Kriterien.

2.1.1. Aminoschutzgruppen

Aminoschutzgruppen werden für die N-terminale Aminogruppe und für ε-Aminofunktion des Lysins und Ornithins benötigt. Aber auch die temporäre Blockierung von Acylaminosäurehydraziden, die die Vorstufen für die Azid-Methode darstellen, gelingt mit verschiedenen Schutzgruppen dieses Typs.

3. LITERATURÜBERSICHT ZUR ABSPALTUNG VON SCHUTZGRUPPEN

3.1. Abspaltung mit Natrium in flüssigem Ammoniak

Dieses Verfahren ist die älteste und gleichzeitig "härteste" Methode zur Demaskierung von Peptiden; zahlreiche Nebenreaktionen sind bereits aufgeklärt worden. So folgt aus den Studien verschiedener Autoren [16-22] bei Threonyl-Prolyl-Sequenzen Spaltung der Peptidbindung [19], in Cysteinylpeptiden Entschwefelung [16-18] teilweiser Verlust von Threonin [20] und Arginin [21], Entmethylierung von Methionin [22] und Zerstörung des Indolkerns des Tryptophans [23].

3.2. Abspaltung mit Fluorewasserstoff [24]

Merrifield et al. [25] berichteten über die Schwierigkeiten bei der Festphasenpeptidsynthese unter Verwendung fluorwasserstofflabiler Schutzgruppen; mit Fluorwasserstoff erfolgt auch gleichzeitig die Abspaltung des Peptids vom Trägerharz. Die schrittweise Ankondensation von N-tert-Butyloxycarbonylaminosäuren fordert nach jeder Kupplungsreaktion die Freisetzung der α-Aminogruppe durch eine Trifluoressigsäurebehandlung. Unter diesen Bedingungen treten einerseits Nebenreaktionen an den Seitenketten der Aminosäure auf (siehe Trifluoressigsäure-Deblockierung) und andererseits sind einige Seitenkettenschutzgruppen nicht stabil genug, wie z.B. die N^{ε}-Benzyloxycarbonylgruppe des Lysins [26] und der Benzylether des Tyrosins [27]. Von Hancock und et al. [28] wurde über Stabilität von S-Benzylcystein berichtet. Besser ist die Verwendung von modifizierten fluorwasserstofflabilen Schutzgruppen wie 4-Nitrobenzyloxycarbonyl [26] für Lysin bzw. 3-Brombenzyl [27] für

Tyrosin. Eine Abwandlung des Schwefelschutzes ist ebenfalls empfehlenswert, z.B. die Verwendung von S-tert-Butylcystein [29], wodurch aber eine gesonderte Spaltung der Thioethergruppierung notwendig wird. Auch dann ist die HF-Abspaltung nicht unproblematisch. Erickson und Merrifield [31] stellten fest, daß unter solchen Bedingungen Kernsubstitution am Tyrosin und Oxidation von Tryptophan erfolgten. Alkylierungen können zwar durch Zusatz von Anisol zurückgedrängt, aber nicht ganz vermieden werden, zumal vorhandene tert-Butyloxycarbonylschutzgruppen in HF zu stärkeren Nebenreaktionen neigen als in TFA. Flüssiger HF ist so sauer, daß es zur Schädigung von Glutaminsäure- und Asparaginsäurepeptiden kommt. Aus den seitenständigen Carboxylgruppen bilden sich intermediär reaktive Acylkationen, die entweder unter Cyclisierung [32,34] oder mit dem zugesetzten Carbeniumionenfänger Anisol reagieren. Ein besserer Weg zur Endabspaltung der konstanten Schutzgruppen wurde von Meienhofer und Mitarbeiter [35] vorgeschlagen. Außerdem untersuchten Tam et al. [46] die S_N1 und S_N2-Mechanismen bei der Schutzgruppenabspaltung von Peptiden mit Fluorwasserstoff. Sie fanden, daß mit HF/Dimethylsulfat (1:3, v/v) und unter S_N2-Reaktionsbedingungen die elektrophile Alkylierungsnebenreaktion zwar zurückgedrängt werden kann, aber niemals ganz vermieden werden.

3.3. Abspaltung mit Trifluoressigsäure

Vergleicht man die Abspaltung der konstanten Schutzgruppen mittels TFA mit der Fluorwasserstoffdeblockierung, so hat die erste Methode folgende Vorteile gegenüber der zweiten:

a) Schonendere Abspaltungsbedingungen,
b) weniger Nebenreaktionen,
c) geringer apparativer Aufwand.

Nachteilig ist die aufwendige Synthese einiger seitenkettengeschützter Aminosäuren wie tert-Butylester und -ether. Wie von Schaffer und Mitarbeiter [36] berichtet, bildet Trifluoressigsäure mit der tert-Butylabgangsgruppe das tert-Butyltrifluoracetat. Dieses gebildete tert-Butyltrifluoracetat kann z.B. den Indolkern des Tryptophans [37-40] oder die Thioethergruppe des Methionins [41] angreifen und kann in geringem Umfang den Phenolkern des Tyrosins [42,43] butylieren. Trotz der Verwendung von Kationenfängern wie Thiophenol, Ethandithiol oder Mercaptoethanol, können Nebenreaktionen am Tryptophan und Methionin nur zurückgedrängt und nicht ausgeschlossen werden [43]. Die Oxidation des Tryptophans ist durch die reduktiv wirkenden Carbeniumionenfänger ausgeschlossen [44]. Löw und Mitarbeiter [45] fanden bei der Abspaltung der Boc-Gruppe vom Boc-Trp-Gly-OMe mit TFA 10 %ige tert-Butylierung des Indolringes des Tryptophans.

3.4. Bisherige kinetische Untersuchungen zur Abspaltung von N-Schutzgruppen

1965 untersuchten Blaha und Rudinger [49] die Spaltungsgeschwindigkeit verschieden substituierter Benzyloxycarbonyl-Reste mit HBr/Eisessig, während Losse et al. [50] auch über die Kinetik der säurekatalysierten Spaltung von Amino- und Carboxyschutzgruppen berichteten.

Sieber et al. [4] untersuchten 1968 die acidolytische Abspaltung von N-Aralkyloxycarbonylschutzgruppen in mehreren Säuregemischen. Die kinetischen Daten seiner Untersuchungen sind in Tabelle 1 und 2 zusammengefaßt.

Tabelle 1: Spaltungsgeschwindigkeiten von R-NH-CH_2-$COOC_2H_5$ bei 22-25°C

Verw. Nr.	Säuregemisch	R = Phenylisopropyl-oxycarbonyl		R = Boc[a]			Relative Geschw.
		50 % Spaltg.	k_1 [h^{-1}]	1 % Spaltg.	50 % Spaltg.	k_1 [h^{-1}]	Boc = 1
1	Essigsäure/H_2O (9:1) v/v	5 h	0.14	-	-	-	-
2	Essigsäure/H_2O (8:2) v/v 23°C	2 h	0.35	20 h	58 Tage	$5\cdot10^{-4}$	700
3	Essigsäure/H_2O (8:2) v/v 50°C	17 Min.	2.5	1 h	69 h	$1\cdot10^{-2}$	250
4	Essigsäure/H_2O (6:4) v/v	70 Min.	0.6	3.3 h	10 Tage	$3\cdot10^{-3}$	200
5	Chloressigsäure/H_2O (6:4) g/g	1 Min.	43	17 Min	20 h	$3.5\cdot10^{-2}$	1200
6	Methylenchlorid/Chloressigsäure (50:37) v/v	8 Min.	5	2 h	138 h	$5\cdot10^{-3}$	1000
7	Methanol/Chloressigsäure (80:20) v/g	sehr langsame Spaltung		nach 6 Tagen keine Spaltung			
8	Ameisensäure/H_2O (3:1) g/g	momentan		1.2 Min.	83 Min.	0.5	
9	Eisessig-83 % (g/g) Ameisensäure-Wasser 7:1:2 (v/v)	28 Min.	1.5	5 h	14 Tage	$2\cdot10^{-3}$	750
10	Eisessig-83 % (g/g) Ameisensäure-Wasser 7:1:2 (v/v) + Natriumchlorid[b]	4 Min.	11	-	-	-	-

a) Spaltung von Z-Lys(Boc)-OH·DCHA: Nr. 2, $k_1 = 2.3\cdot10^{-4}\ h^{-1}$; Nr. 5, $k_1 = 2\cdot10^{-2}\ h^{-1}$; Nr. 8, $k_1 = 0.5\ h^{-1}$; Nr. 9, $k_1 = 8\cdot10^{-4}$ h, Nr. 10, $k_1 = 6\cdot10^{-3}\ h^{-1}$

b)

Tabelle 2: Spaltung verschiedener Schutzgruppen von N-geschützten Glycin-Ethylestern R-NH-CH_2-$COOC_2H_5$ mit Essigsäure/H_2O (8:2) v/v bei 22-25°C [4]

Nr.	Substituent: R	50 % Spaltg.	$k_1 \cdot [h^{-1}]$	k_1 relativ
1	t-Butyloxycarbonyl	58 Tage	$5 \cdot 10^{-4}$	1
2	Vinylisopropyloxycarbonyl	14 h	$5 \cdot 10^{-2}$	100
3	Phenylisopropyloxycarbonyl	2 h	0.35	700
4	2-(p-Biphenyl)-isopropyl-oxycarbonyl	30 Min.	1.4	3 000
5	p-Methylphenylisopropyl-oxycarbonyl	7 Min.	5.6	11 000
6	Diphenylmethoxycarbonyl	42 Tage	$7 \cdot 10^{-4}$	1
7	4,4'-Dimethyldiphenyl-methoxycarbonyl	7 h	0.1	200
8	4,4'-Dimethoxy-diphenyl-methoxycarbonyl	1 Min.	33	66 000
	zum Vergleich			
9	Tritylglycinethylester	4 Min.	10.4	21 000
10	4,4'-Dimethyldiphenyl-methoxycarbonylglycin	nach 28 Tagen gespalten*)	0.1 %	-
11	4,4'-Dimethoxydiphenyl-methoxycarbonylglycin	12 Tage	$2.5 \cdot 10^{-3}$*)	5

*) Dünnschichtchromatographisch bestimmt

Nach dem von Sieber [4] formulierten $A_{AL}1$-Mechanismus ist zu erwarten, daß die Spaltungsgeschwindigkeit dann erhöht wird, wenn die Protonierung als Funktion der Polarität und

der Säurestärke des Mediums begünstigt wird. Wie Tabelle 1 zeigt, wird die Spaltung durch Erhöhung des Prozentgehaltes an Wasser (Vers. 1, 2 und 4) beschleunigt, während in methanolischer Lösung eine drastische Senkung der Spaltungsgeschwindigkeit erfolgt. In stärkeren Säuren (Vers. 5, 6 und 8-10) findet eine raschere Spaltung statt, doch scheint nicht allein die Dissoziationskonstante eine maßgebliche Rolle zu spielen, sondern auch die Natur des Reaktionsmediums, da z.B. mit Ameisensäure, $p_k = 3.75$ eine raschere Spaltung eintritt (Vers. 8) als mit Chloressigsäure $p_k = 2.85$ (Vers. 5).

Auch Riniker et al. [48] untersuchten die selektive Abspaltung säurelabiler Aminoschutzgruppen von Peptiden in Trifluorethanol/Salzsäure. Sie stellten fest, daß das Verhältnis der Labilitäten von Trt zu Bpoc oder Ppoc je nach dem zur Abspaltung verwendeten Milieu sehr unterschiedlich ist. Eine stark erhöhte Labilität der ersteren gegenüber den Urethanschutzgruppen kann vor allem in Trifluorethanol beobachtet werden.

4. SPEZIELLER TEIL

4.1. Themenstellung

Frühere Untersuchungen zur Einführung der Adpoc-Gruppe [6] in der Peptidsynthese bewiesen die vielseitigen Vorteile dieser Schutzgruppe. Nur liegen in der Literatur sehr wenige kinetische Untersuchungen zur Abspaltung Adpoc-geschützter Aminosäuren oder Peptide vor. Da die Abspaltung der Adpoc-Gruppe mittels 3 % TFA/CH_2Cl_2 sehr rasch aber unter Bildung von Nebenprodukten abläuft (z.B. Adpoc-Trp-Lys(Boc)OH), soll in der vorliegenden Arbeit ein Abspaltungsreagenz gefunden werden, das unter milden Bedingungen relativ schnell, selektiv und möglichst mit weniger Nebenprodukten die Adpoc-Gruppe abspaltet.

Um dieses Problem zu lösen, wurden zunächst möglichst viele Modellverbindungen synthetisiert und durch chemische Reinheitskontrolle charakterisiert. Mit diesen Verbindungen wurden verschiedene Abspaltungsmedien ausprobiert und die Abspaltungsprodukte bzw. die Abspaltung mittels HPLC und Dünnschichtchromatographie verfolgt.

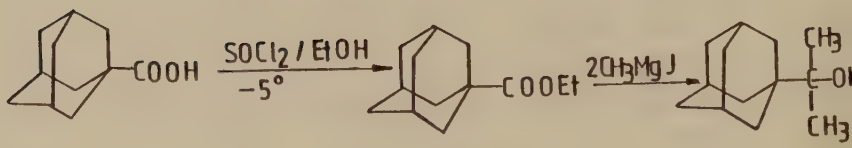
4.2. Zur Synthese der Modellverbindungen

Da die acidolytische Abspaltung zur selektiven Entfernung der Adpoc-Gruppe neben den Schutzgruppen vom t-Butyltyp gezeigt werden soll, werden folgende Modellverbindungen nach der klassischen Methode synthetisiert und charakterisiert. Adpoc-Lys(Boc)-OH, Adpoc-Trp-Lys(Boc)-OH, Adpoc-Leu-Trp-OH, Adpoc-Leu-Trp-OMe, Adpoc-Leu-Trp-Met-OMe, Adpoc-Leu-Trp-Met-OH, Adpoc-Leu-Pro-OMe, Adpoc-Ser(Bu^t)-OH, Adpoc-Tyr(Bzl)-OH, Adpoc-Ala-Lys(Boc)-Pro-OMe und Adpoc-geschützte Aminosäuren. In Tabelle 3 sind die physikalischen Daten einiger Modellverbindungen zusammengefaßt.

Tabelle 3: Physikalische Eigenschaften der Modellpeptide .

Verbindung	Ausbeute (%)	Fp °C	$[\alpha]_D^{20-25°}$	Elementaranalyse	C	H	N	S
Adpoc-Leu-Trp-OH	80	185-186	+7.1° (c=1,MeOH)	Ber.	69.25	8.06	7.81	
				Gef.	68.98	8.09	7.75	
Adpoc-Trp-Lys(Boc)-OH	87	140-141	-9.82° (c=0.5,MeOH)	Ber.	66.23	8.02	8.58	
				Gef.	64.83	8.16	8.20	
Adpoc-Leu-Trp-OMe	72	158-160	-9.2° (c=2.2,MeOH)	Ber.	69.67	8.22	7.61	
				Gef.	69.63	8.40	7.64	
Adpoc-Leu-Trp-Met-OMe	80	105-106	-15.2° (c=1,MeOH)	Ber.	65.08	7.97	8.20	4.69
				Gef.	65.24	8.10	7.94	3.89
Adpoc-Leu-Trp-Met-OH	95	134-136	-14.8° (c=1,MeOH)	Ber.	64.65	7.84	8.73	4.78
				Gef.	63.47	8.28	8.00	5.73
Adpoc-Leu-Pro-OMe	95	144	-50.0° (c=1,$CHCl_3$)	Ber.	67.50	9.15	6.06	
				Gef.	67.30	9.06	6.13	

4.2.1. Synthese der Ausgangsverbindungen und Einführungsreagenzien



Schema 1: Reaktionsschema zur Darstellung von Adpoc-OH.

Zur Darstellung der Adpoc-Aminosäuren und der Modellverbindungen wird als erstes die Synthese von 2-(1-Adamantyl)-propan-2-ol benötigt. Aus der käuflichen 1-Adamantancarbonsäure und Thionylchlorid (frisch destilliert) in absolutem Ethanol bei $-5^{\circ}C$ wird der Ethylester in hohen Ausbeuten erhalten. Der so erhaltene 1-Adamantancarbonsäureethylester wird durch eine Grignard-Reaktion zu dem entsprechenden Carbinol in hohen Ausbeuten umgesetzt.

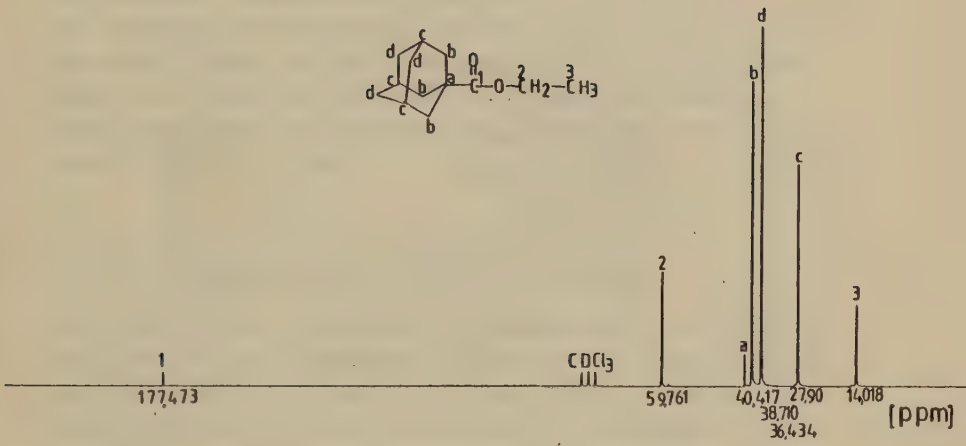


Abbildung 1: ^{13}C-NMR von 1-Adamantancarbonsäureethylester, 200 mg in 2 ml $CDCl_3$, 125 Hz/cm, 4200 Puls-interferogramme, protonenbreitbandentkoppelt.

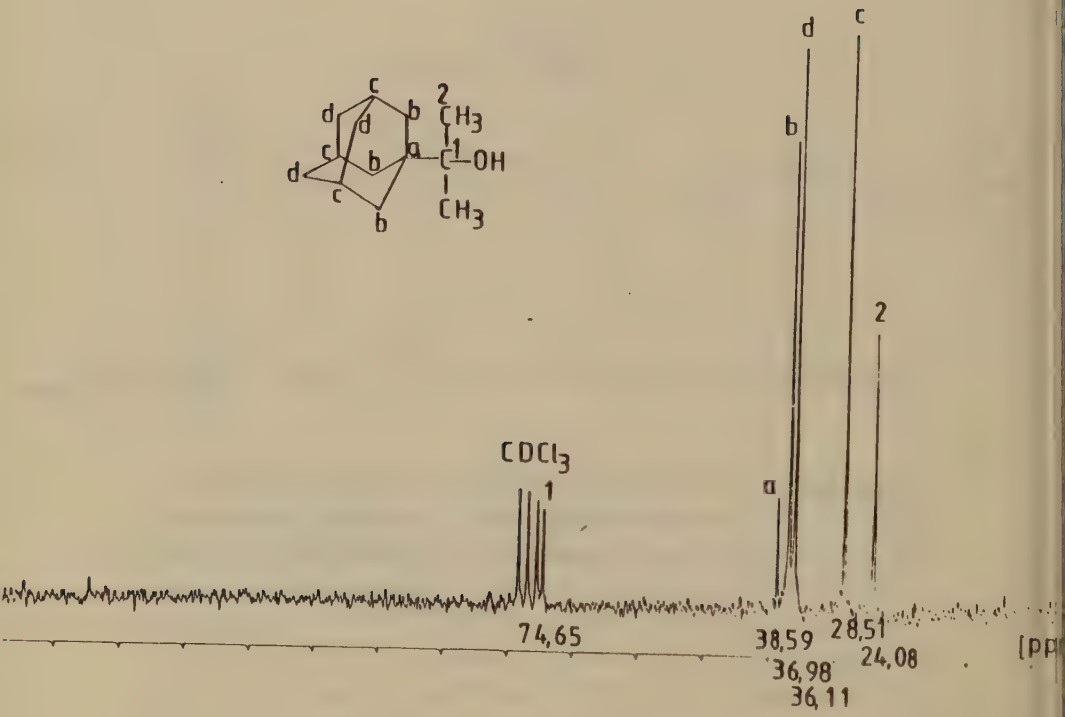


Abbildung 2: ^{13}C-NMR von 2-(1-Adamantyl)-propan-2-ol; 200 mg in 2 ml $CDCl_3$, 100 Hz/cm, protonenbreitbandentkoppelt.

4.2.1.1. Adpoc-fluorid (Adpoc-F)

Adpoc-F wird nach einer verbesserten Synthese bei -30°C aus 2-(1-Adamantyl)-propan-2-ol und Fluorcarbonylchlorid in 82 %iger Ausbeute hergestellt. Man sollte bei der Herstellung von Adpoc-F aus Adpoc-OH und COClF nicht bei zu

niedrigen Temperaturen (z.B. -60°C) arbeiten, da bei dieser Temperatur 2-(1-Adamantyl)-propan-2-ol ausfriert und keine vollständige Umsetzung stattfindet. Adpoc-F ist zwar bei dieser Temperatur sehr stabil, man kann allerdings keine zufriedenstellende Umsetzung erzielen. Daher ist es zweckmäßig, die Umsetzung bei -30°C durchzuführen. Hierbei konnte eine fast vollständige Umsetzung ohne Zersetzung des Adpoc-F erzielt werden.

4.2.1.2. Darstellung der Adpoc-Aminosäuren

Die Einführung der Adpoc-Gruppe gelingt über Triethylammoniumsalze in organischen Lösungsmitteln oder in wäßrigen organischen Lösungsmitteln bei -10°C bis 0°C in guten Ausbeuten. Die so hergestellten Adpoc-Aminosäurederivate konnten in sehr hoher Reinheit und z.T. kristallin gewonnen werden. Die dargestellte Adpoc-Aminosäuren und ihre physikalischen Eigenschaften sind in der Tabelle 4 aufgeführt.

4.2.1.2.1. ^{13}C-NMR-Spektroskopie von Adpoc-Aminosäuren

Die ^{13}C-NMR-Spektroskopie dient als eine aussagekräftige Methode zur Strukturaufklärung chemischer Verbindungen. Die Auswertung der Adpoc-Aminosäurespektra erfolgt nach bestimmten Regeln und durch Vergleich mit anderen Verbindungen [51,52]. In Tabelle 5 sind die ^{13}C-chemischen Verschiebungen einiger Adpoc-Aminosäuren zusammengestellt.

Tabelle 4: Ausbeute und Charakterisierungsdaten der hergestellten Adpoc-Aminosäuren.

Verbindung	Ausbeute (%)	Fp °C (Umkr.aus)	$[\alpha]_D^{20-23}$	Summenformel (Molmasse)		C	H	N
Adpoc-Leu-OH	97	180-181 (Ether/Hexan)	-12.05° (c=1,MeOH)	$C_{20}H_{33}NO_4$ (351.49)	Ber.	68.34	9.46	3.98
					Gef.	67.72	9.89	3.94
Adpoc-Leu-OSu	90	140-141 (Diisopropyl-ether)	-34.3° (c=0.98,MeOH)	$C_{24}H_{36}N_2O_6$ (448.566)	Ber.	64.26	8.09	6.25
					Gef.	64.06	8.15	6.23
Adpoc-Gly-OH	76	178-180 (MeOH/Ether)	-	$C_{16}H_{25}NO_4$ (295.38)	Ber.	65.06	8.53	4.74
					Gef.	65.22	8.60	4.81
Adpoc-Gly-OEt	88	89-90 (Ether/Hexan)	-	$C_{18}H_{29}NO_4$ (323.43)	Ber.	66.84	9.04	4.33
					Gef.	67.52	9.22	4.38
Adpoc-Pro-OH	78	130-131	-28.6° (c=1,MeOH)	$C_{19}H_{29}NO_4$ (335.44)	Ber.	68.03	8.71	4.17
					Gef.	68.18	8.84	4.09
Adpoc-Trp-OSu	87	69 (Isoprop./ Ether)	-8.97° (c=1.2,MeOH)	$C_{29}H_{35}N_3O_6$ (521.62)	Ber.	66.78	6.76	8.05
					Gef.	67.17	7.37	7.62
Adpoc-Lys(Z)-OH	90	Öl	+8.2 (c=2,$CHCl_3$)	$C_{28}H_{40}N_2O_6$ (500.628)	Ber.	67.18	8.05	5.59
					Gef.	67.66	8.73	4.78

Fortsetzung von Tabelle 4.

Verbindung	Ausbeute (%)	Fp °C (Umkr. aus)	$[\alpha]_D^{20-23}$	Summenformel (Molmasse)		C	H	N
Adpoc-Trp-OH	90	120 (Ether/Hexan)	-6.7° (c=1,MeOH)	$C_{25}H_{32}N_2O_4$ (424.54)	Ber.	70.53	7.60	6.60
					Gef.	71.51	8.16	6.05
Adpoc-Val-OH	85	150 (Ether/Hexan)	-3.0° (c=1,MeOH)	$C_{19}H_{31}NO_4$ (337.46)	Ber.	67.63	9.26	4.15
					Gef.	67.53	9.27	4.12
Adpoc-Lys(Boc)-OH	87	71-75 (amor.)	-2.8° (c=1,MeOH)	$C_{25}H_{42}N_2O_6$ (466.62)	Ber.	64.35	9.07	6.00
					Gef.	64.01	9.39	5.87
·DCHA	71	228-229 (Ether/Hexan)		$C_{37}H_{65}N_3O_6$ (647.927)	Ber.	68.59	10.11	6.48
					Gef.	68.61	10.42	6.16
Adpoc-Ile-OH	91.5	80	+2.75° (c=1,MeOH)	$C_{20}H_{36}NO_4$ (354.508)	Ber.	67.76	10.23	3.95
					Gef.	67.52	9.41	3.77
Adpoc-Tyr(OBzl)-OH	85	128		$C_{30}H_{38}NO_5$ (492.634)	Ber.	73.14	7.77	2.84
					Gef.	72.93	7.65	2.77

Tabelle 5: ^{13}C-chemische Verschiebungen (δ-Werte bezogen auf TMS) einiger Adpoc-Aminosäuren.

	Aminosäurehälfte						Adpoc-Gruppe					
Verbindung (Lösungsmittel)	COOH (-O-CO-)	C_α	C_β	C_γ	C_δ	Arom.	a	b	c	d	C_q	CH_3
Ala-OH ($CDCl_3$)	177.42 (156.94)	49.89	18.82				39.70	37.02	28.48	35.96	87.07	18.83
Ile-OH ($CDCl_3$)	176.95 (156.18)	57.83	37.86	25.09 15.29	11.67		39.63	37.02	28.49	35.91	86.68	19.76
Leu-OH (CD_3OD)	177.07 (158.63)	52.24	40.98	23.40	21.81 20.38		38.19	37.45	30.11	36.99	87.06	19.30
Ser(Bu^t)-OH ($CDCl_3$)	175.72 (156.03)	53.90	61.78				39.52	36.96	28.43	35.81	86.79	19.68
Bu^t:	73.94 27.16											
Gly-OH ($DMSOd_6$)	171.83 (156.14)	43.11					40.34	36.59	27.99	35.26	84.03	19.52
Pro-OH (CD_3OD)	176.46 (156.16)	60.22	32.07	24.23	47.12		41.07	38.08	30.04	37.00	88.44	20.44
Phe·DCHA (CD_3OD)	177.28 (156.48)	57.36	38.99			138.56 129.80 128.00 125.24	39.96	37.96	29.16	36.09	85.43	19.39

4.2.2. Synthese von Adpoc-Trp-Lys(Boc)OH

Das Modellpeptid wurde durch Umsetzung der aktivierten Ester des Adpoc-Tryptophans mit dem Natriumsalz des N - Boc-Lysins in Wasser/Dioxan synthetisiert. Dieser Syntheseweg war trotz der vorteilhaften Kupplungsmethode nicht unproblematisch, da die Darstellung einer reinen Verbindung nicht gelang. Auch durch mehrmalige Umkristallisation konnte kein reines Dipeptid isoliert werden. Es war wahrscheinlich bei der Kupplung eine partielle Verseifung des aktivierten Esters eingetreten und daraus entstand ein Gemisch aus N-geschütztem Dipeptid und N-geschützter Carboxykomponente, die durch Umkristallisation nicht trennbar waren. Letztlich gelang die Trennung über LH-20-Säulenchromatographie.

4.2.3. Synthese von Adpoc-Leu-Trp-OMe

Um ein einheitlich, razemisierungssicheres Produkt zu synthetisieren, wurde die DCCI/HOBt-Kupplungsmethode angewandt.
Wie in der Literatur bekannt, dienen die DCCI/HOBt- [53-55], DCCI/HOSu- [56-58] und die Azidkupplung nach Rudinger und Mitarbeitern [59] als razemisierungssichere Methode für die klassische Peptidsynthese. Diese Kupplungsmethode führte zur Synthese des gewünschten Dipeptids in 72 % Ausbeute.

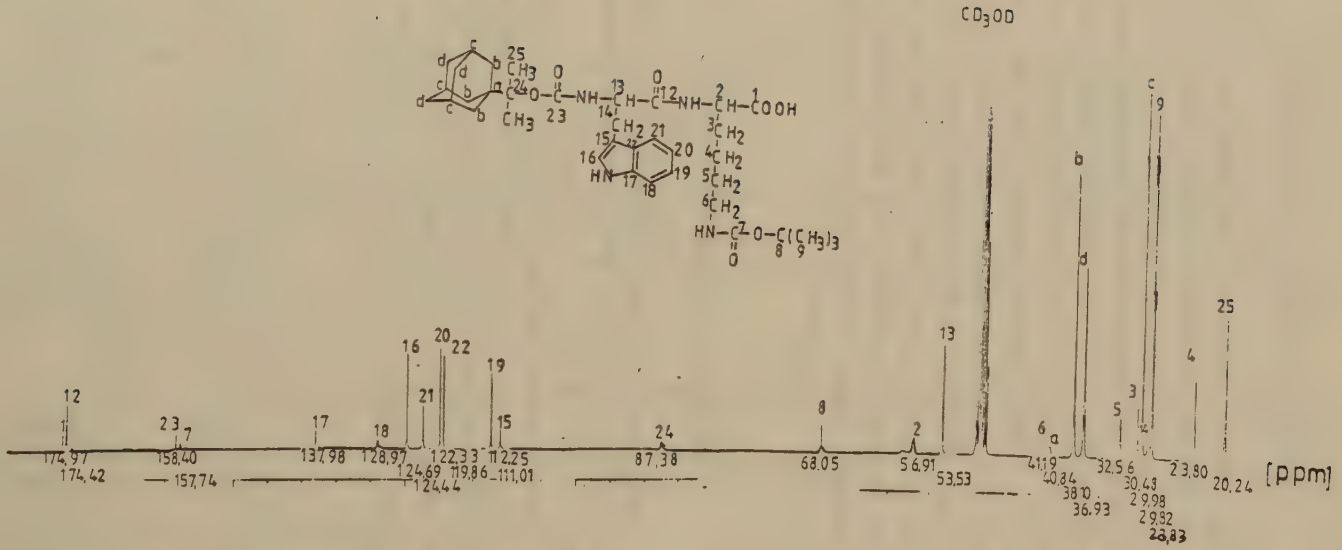


Abbildung 3: ^{13}C-NMR-Spektrum von Adpoc-Trp-Lys(Boc)-OH, 200 mg in 2 ml CD_3OD, 300 MHz/cm, protonenbreitbandentkoppelt.

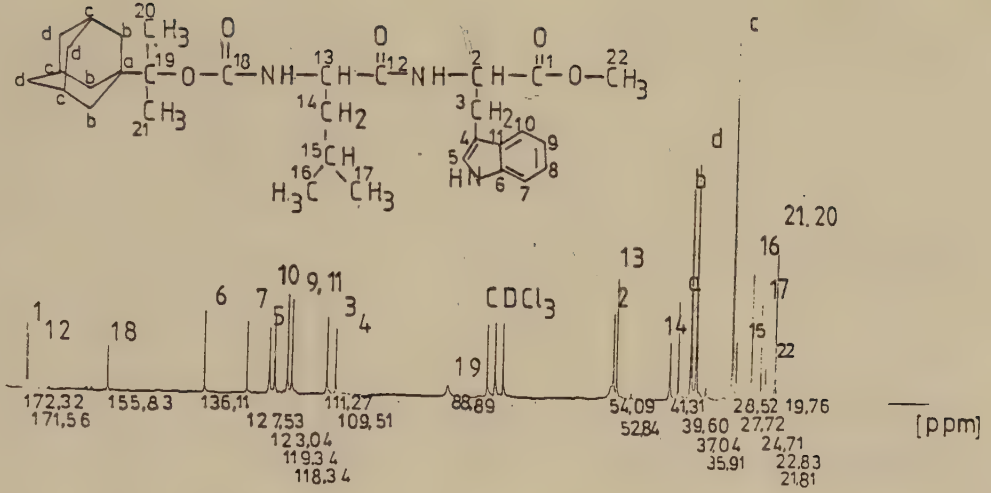
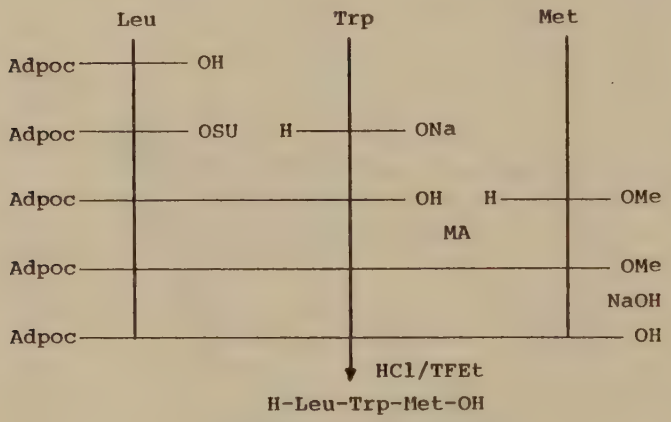


Abbildung 4: ^{13}C-NMR-Spektrum von Adpoc-Leu-Trp-OMe, 200 mg in 1.5 ml $CDCl_3$, protonenbreitbandentkoppelt.

4.2.4. Synthese von Adpoc-Leu-Trp-Met-OH

Syntheseweg 1



Syntheseschema 1: Darstellung von Adpoc-Leu-Trp-Met-OH.

Die Titelverbindung wurde bereits in der Literatur [60] unter Verwendung der Boc-Gruppe synthetisiert. Doch konnte man das Peptid nach Gegenstromverteilung lediglich in 85 %iger Reinheit erhalten (HPLC). Man stellte bei der Abspaltung der Boc-Gruppe Nebenprodukte fest. Um die auftretenden Nebenreaktionen zu vermeiden, sollte man die Adpoc-Gruppe, die sich sehr leicht unter milden acidolytischen Bedingungen abspalten läßt, zur Synthese des Modellpeptids anwenden. Um dieses Problem zu lösen wurde zuerst das Syntheseschema 1 angewandt. Aus dem Aktivester von Adpoc-Leu und dem Natriumsalz des Tryptophans erhält man Adpoc-Leu-Trp-OH kristallin in 80 %iger Ausbeute. Nach der Methode der gemischten Anhydride [76] kuppelt man das Dipeptid mit dem Methioninmethylester im Stickstoffstrom

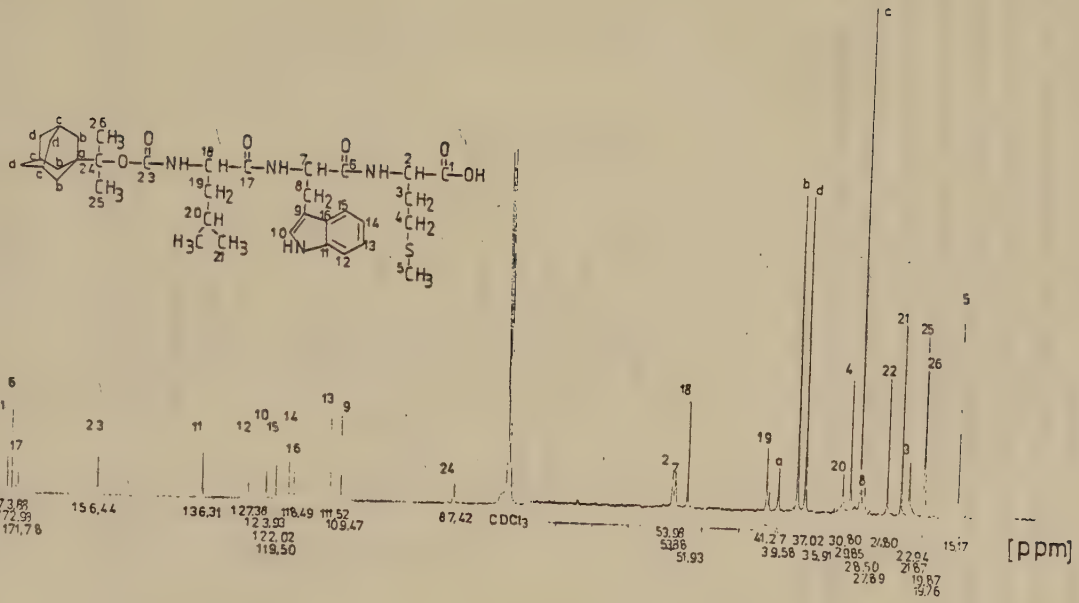
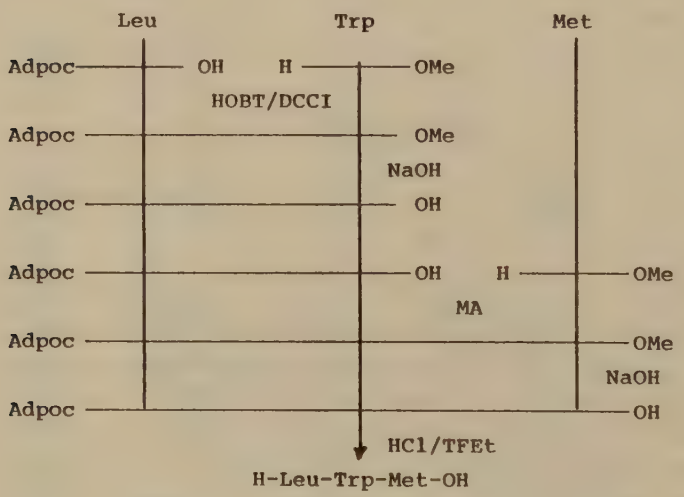


Abbildung 5: ^{13}C-NMR-Spektrum von Adpoc-Leu-Trp-Met-OH, 150 mg in 1.5 ml $CDCl_3$, protonenbreitbandentkoppelt.

zum Tripeptid. Luftsauerstoffausschluß war notwendig, um unerwünschte Nebenreaktionen wie Oxidation der Thioether-Gruppe des Methionins zu verhindern. Durch Verwendung von Chlorameisensäureisobutylester und N-Methylmorpholin konnte bei -30°C die Razemisierung vollständig ausgeschlossen werden. Bei dieser Methode erhält man ein chromatographisch reines Produkt in hoher Ausbeute. Die Weiteraufarbeitung des Tripeptids erfolgt durch alkalische Verseifung zum Zielpeptid in 95 %iger Ausbeute.

Syntheseweg 2



Syntheseschema 2: Darstellung von Adpoc-Leu-Trp-Met-OH:

Wie aus Syntheseschema 2 ersichtlich ist, wird durch Voraktivierung von Adpoc-Leu-OH mit Hydroxybenzotriazol/DCCI Adpoc-Leu mit Tryptophanmethylesterhydrochlorid zum Dipeptid in guten Ausbeuten gekuppelt. Diese Methode führt zu

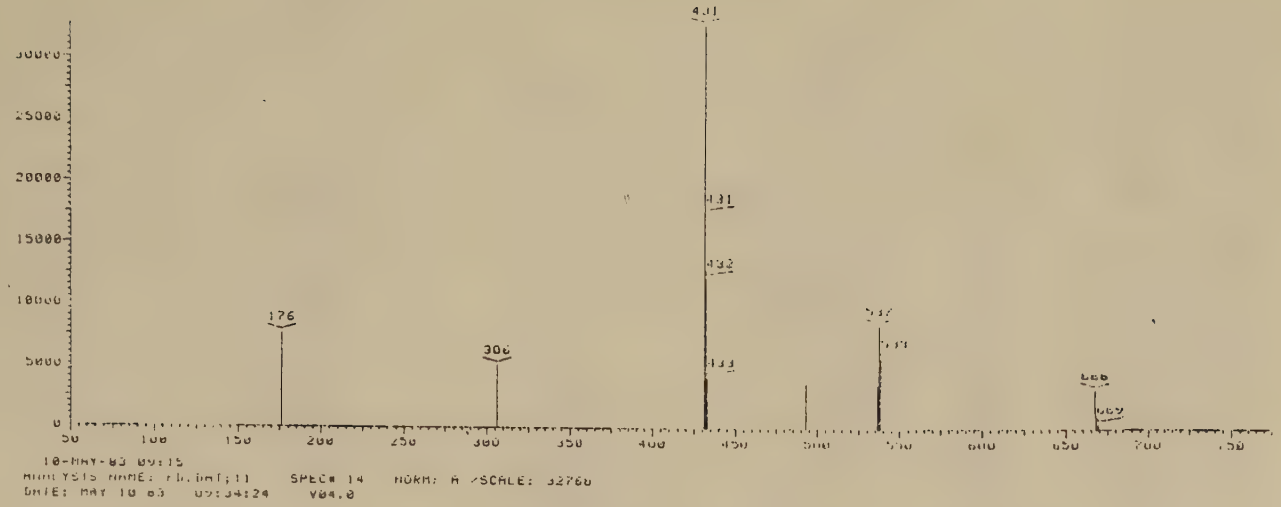


Abbildung 6: FD-MS-Spektrum von Adpoc-Leu-Trp-Met-OH. Lösungsmittel: $CDCl_3$, Temperatur 60°C .

Interpretation der wichtigsten Fragmentionen

m/e	Fragmention
668	$[M]^+$
537	$M^+ - (Met)^+$
431	(Leu-Trp-Met) - H_2O
176	(Adpoc-)$^+$

erheblicher Verkürzung der Reaktionszeit und zu einem chromatographisch reinen, einheitlichen Produkt. Nach alkalischer Verseifung von Adpoc-Leu-Trp-OMe erhält man in 95 %iger Ausbeute Adpoc-Leu-Trp-OH. Der weitere Syntheseweg erfolgt wie in Syntheseschema 1 angegeben.

4.2.5. Synthese von Adpoc-Leu-Pro-OMe
[Thymosin β_9 (28-29)]

Das Peptid wird durch Kupplung von Adpoc-Leu-OH mit H-Pro-OMe nach der razemisierungssenkenden Hydroxyobenzotrial/Dicyclohexylcarbodiimid-Methode in kristalliner Form und sehr guter Ausbeute hergestellt.

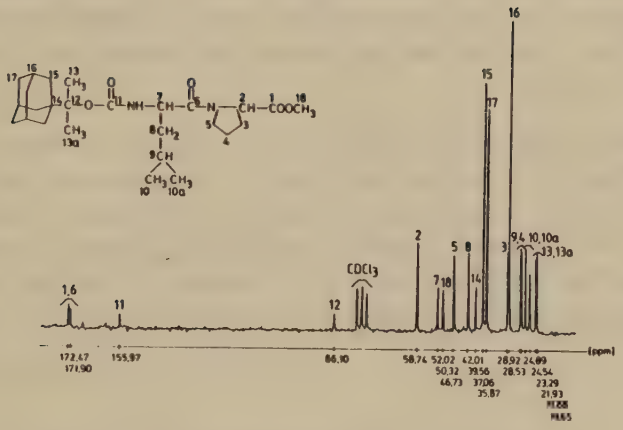


Abbildung 7: ^{13}C-NMR-Spektrum von Adpoc-Leu-Pro-OMe protonenbreitbandentkoppelt, 20.115 MHz, 300 mg in 1.5 ml $CDCl_3$.

5. ZUR KINETIK

5.1. Allgemein

Kinetische Untersuchungen spielen für die Aufklärung von Reaktionsmechanismen eine wichtige Rolle. Ferner können durch kinetische Untersuchungen Bestimmungen von Reaktionsordnungen, Geschwindigkeitskonstanten, Aktivierungsparametern und Einflüsse der Strukturen der Reaktanten ermittelt werden. In der vorliegenden Arbeit soll die Abspaltungsgeschwindigkeit der Adpoc-Gruppe, Adpoc-geschützter Aminosäuren bzw. Peptide bei Raumtemperatur mittels HPLC bestimmt werden.

Chemische Reaktionen können mit sehr unterschiedlicher Geschwindigkeit ablaufen. Bei kinetischen Messungen geht man im allgemeinen von einem definierten Ausgangszustand aus. Er ist zum Beispiel gegeben, wenn die Temperatur des Reaktionsmediums definiert ist und die Konzentration der Reaktionspartner sich nur durch die betreffende Reaktion selbst ändert.

5.2. Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten

Für die Bestimmung der Reaktionsordnung und der Geschwindigkeitskonstanten gibt es verschiedene Methoden, die entweder vom differentiellen Zeitgesetz (z.B. Methode der Anfangsgeschwindigkeiten) oder integrierten Zeitgesetzt (z.B. Einsetzmethode, Halbwertszeitmethode) ausgehen. In der vorliegenden Untersuchung wird die integrierte Zeitgesetzmethode zur Bestimmung der kinetischen Parameter angewandt:

$$A + B \underset{K_{-1}}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} C + D$$

Das integrierte Zeitgesetz lautet:

$$-\frac{d[A]}{dt} = -\frac{d[B]}{dt} = \frac{d[C]}{dt} = \frac{d[D]}{dt} = K_1[A][B]-K_{-1}[C][D]$$

daraus ergibt sich (vereinfacht):

$$-\frac{d[A]}{dt} = K_1[A][B], \text{ für Überschuß an Säure} = [B].$$

Es gilt eine Reaktion der Pseudoordnung 1. Grades, d.h.

$$-\frac{d[A]}{dt} = K_1'[A]$$

$$K_1' = \frac{\ln \frac{[A]}{[A]_o}}{t}$$

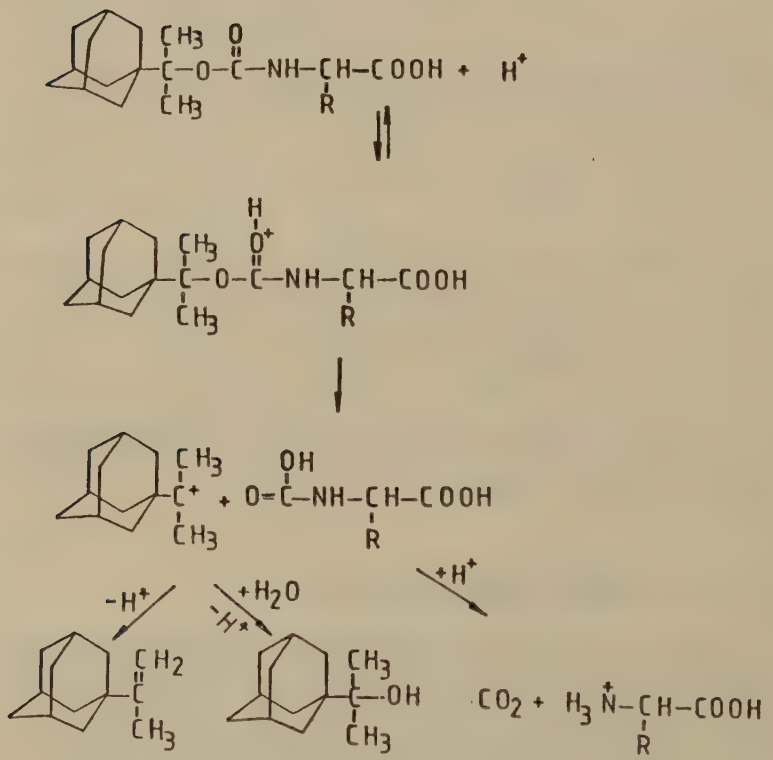
$$\ln \frac{[A]}{[A]_o} = -K_1' \cdot t.$$

Nach diesem integriertem Zeitgesetz sind alle Geschwindigkeitskonstanten ermittelt.

5.3. Abspaltungsmechanismus

Ehe man mit der kinetischen Analyse einer Reaktion beginnen kann, muß ihre Stöchiometrie bekannt sein. Bei gegebener und über den gesamten Umsatzbereich konstanter Stöchiometrie genügt es, zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit einen Stoff analytisch zu erfassen. Die Konzentrationsänderung aller anderen an der Reaktion beteiligten Partner ist dann durch die stöchiometrische Gleichung festgelegt.

Die Säure-katalysierte Abspaltung von Amino-Schutzgruppen erfolgt im Primärschritt über die Protonierung am nucleophilen Zentrum. Demgemäß reagieren speziell die Urethan-Gruppen nach folgendem Schema:



Schema 2: Abspaltungsmechanismus der Adpoc-Gruppe.

Die Abspaltung verläuft nach dem A_{AL}-Mechanismus der für Estergruppen gilt [7].

5.4. Bestimmung der Spaltungsgeschwindigkeit durch HPLC

In den letzten Jahren hat sich die "reversed-phase"-Hochdruckflüssigkeitschromatographie als eine zuverlässige, aussagekräftige Methode zur qualitativen und quantitativen Analysen von Aminosäuren, geschützten und ungeschützten Peptiden [61-72] erwiesen.

Um eine genaue kinetische Untersuchung der Abspaltung zu verfolgen, wird die HPLC-Methode angewandt. Neben einer Verfolgung des Edukt-Produkt-Verhältnisses können während der Deblockierung gegebenenfalls auftretende Nebenprodukte mit dieser Methode gut analysiert werden. Dabei müssen Trennsysteme gefunden werden, welche die bei der Reaktion auftretende Produkte in zufriedenstellender Weise trennen. Durch Variation von Phosphat- bzw. Acetatpufferlösungen mit Acetonitril oder Methanol bei verschiedenen pH-Werten, oder "reversed-phase"-Ionenpaarchromatographie mit Dodecansulfonsäure, Heptansulfonsäure und Tetrabutylammoniumchlorid in organischen Lösungsmitteln wie Acetonitril oder Methanol werden bei pH 4 bis 4.4 die Trennungen durchgeführt. Die Trennungen erfolgen auf folgenden Säulen: 4 x 125 mm Li-Chrosorb RP-18 (5 µm), 4 x 125 mm Sphrerisorb ODS (3 µm) und 4 x 250 mm LiChrosorb RP-18 (5 µm).

5.5. Suche nach geeigneten Abspaltungsreagenzien

Nach früheren Untersuchungen kann die Adpoc-Gruppe von Adpoc-Trp-OH mit 3 % TFA/CH_2Cl_2 in ca. 2 Minuten oder mit HAc/83 % HCOOH/H_2O 7:1:2 (v/v) innerhalb 2 Stunden abgespalten werden [102]. Wenn man die gleichen Bedingungen der Abspaltung für andere Adpoc-geschützte Verbindungen, z.B. Adpoc-Trp-Lys(Boc)OH anwendet, so kann man feststellen, daß eine selektive Abspaltung nicht erreicht wird (insbesondere mit 3 % TFA/CH_2Cl_2). Daher war es notwendig, Abspaltungsreagenzien zu finden, die

a) relativ schnell,
b) selektiv und
c) unter Bildung von möglichst wenig Nebenprodukten

die Adpoc-Gruppe abspalten.

Es werden verschiedene Säuregemische zur Adpoc-Abspaltung Adpoc-geschützter tryptophanhaltiger Dipeptide bzw. Adpoc-geschützter Aminosäuren untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengestellt.

Tabelle 6: Abspaltung der Adpoc-Gruppe mit verschiedenen Säuregemischen.

Säuregemisch	Verbindung	Bemerkungen
3 % TFA(frisch)/ CH_2Cl_2	Adpoc-Leu-Trp-OMe	Rasche Abspaltung der Adpoc-Gruppe unter Bildung von Nebenprodukten
2 % TFA(frisch)/ CH_2Cl_2	Adpoc-Lys(Boc)-OH	Abspaltungsreagenz nicht selektiv, weil Boc-Gruppe mitabgespalten wird

Fortsetzung der Tabelle 6.

Säuregemisch	Verbindung	Bemerkungen
1 % TFA(frisch)/ CH_2Cl_2	Adpoc-Lys(Boc)-OH	Keine Selektivität wird erreicht
20 % HCOOH/TFEt (1:1)	Adpoc-Lys(Boc)-OH	Abspaltung der Adpoc-Gruppe verläuft gut, aber langsam; keine Nebenprodukte; die Boc-Gruppe wird nicht abgespalten, $t_{50\ \%}$ = 40 min
50 % HCOOH/TFEt (1:1)	Adpoc-Lys(Boc)-OH	Gute Abspaltung der Adpoc-Gruppe. Boc-Gruppe wird nicht abgespalten $t_{50\ \%}$ = 15 min
80 % HCOOH/TFEt (1:1)		Boc-Gruppe wird abgespalten; rasche Abspaltung der Adpoc-Gruppe $t_{99.9\ \%}$ = 3 min
50 % HCOOH/TFEt (1:1)	Adpoc-Trp-Lys(Boc)-OH	Boc-Gruppe wird nach 1 h abgespalten. $t_{50\ \%}$ = 5 min; $t_{90\ \%}$ = 30 min
50 % HCOOH/TFEt (1:2)		Durch DC- und HPLC-Untersuchungen kann die Bildung eines Nebenproduktes und die Abspaltung der Boc-Gruppe festgestellt werden $t_{50\ \%}$ = 25 min; $t_{99.9\ \%}$ = 3 h
50 HCOOH/TFEt (1:4)		Langsame Abspaltung der Adpoc-Gruppe

Fortsetzung der Tabelle 6.

Säuregemisch	Verbindung	Bemerkungen
0.1 N $HCl_{wäß.}$/ Dioxan (1:4)	Adpoc-Trp-Lys(Boc)-OH	Es wird keine Abspaltung festgestellt
1 N $HCl_{gas.}$/ Dioxan (1:1)		Beide Schutzgruppen werden abgespalten $t_{99.9\ \%}$ = 1 h
0.1 N HCl/MeOH (1:5)	Adpoc-Trp-OH	Abspaltung verläuft sehr langsam, 30 %ige Spaltung nach 2.5 h
50 % HCOOH/TFEt/ $CHCl_3$ (1:9:1)		HPLC zeigt saubere Abspaltung, keine Nebenprodukte sind zu erkennen, $t_{50\ \%}$ = 26.35 min; $t_{99.9\ \%}$ = 140 min
0.1 N HCl/TFEt/ $CHCl_3$ (1:9:1)		HPLC und DC zeigt gute Spaltung der Adpoc-Gruppe ohne Nebenprodukte, $t_{50\ \%}$ = 2 min; $t_{99.9\ \%}$ = 15 min

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß die Säuregemische 0.1 N Salzsäure-Trifluorethanol-Chloroform (1:9:1) v/v und 50 % Ameisenäsure-Trifluorethanol-Chloroform (1:9:1) v/v die besten Abspaltungsreagenzien sind. Zur selektiven Abspaltung der Adpoc-Gruppe in Anwesenheit einer N^{ε}-Boc-Gruppe eignet sich das Gemisch 50 % Ameisensäure-Trifluorethanol am besten. Mit diesem Abspaltungsreagenz wird die Adpoc-Gruppe rasch ohne Bildung von Nebenprodukten abgespalten.

5.5.1. Selektive Abspaltung der säurelabilen Adpoc-Gruppe bei Adpoc-Trp-Lys(Boc)-OH

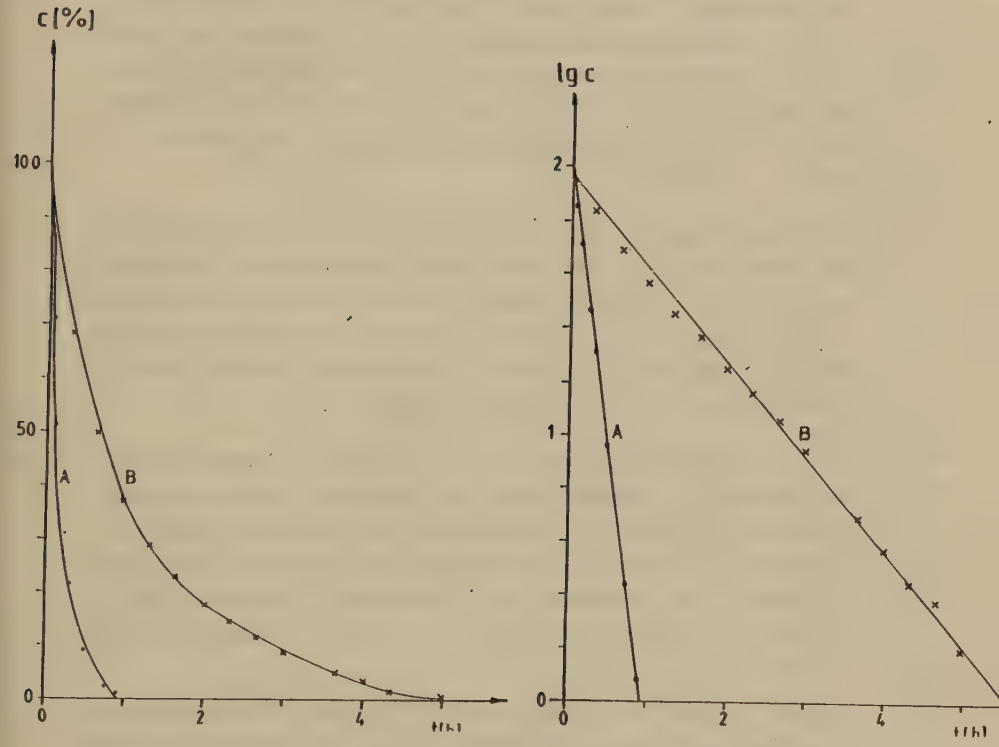


Abbildung 8: Links: Abnahme der Adpoc-Trp-Lys(Boc)-OH-Konzentration während der Abspaltung mit
A: 0.1 N HCl/TFEt/$CHCl_3$ (1:9:1) v/v und
B: 50 % HCOOH/TFEt/$CHCl_3$ (1:9:1) v/v
bei Raumtemperatur
Rechts: Als lg c/t-Diagramm angegeben.

Es wird die selektive Abspaltung der Adpoc-Gruppe gegenüber der N -Boc-Gruppe des Lysins bei der Peptidsequenz Adpoc-Trp-Lys(Boc)-OH mit zwei verschiedenen Abspaltungsreagenzien, 0.1 N Salzsäure/Trifluorethanol/Chloroform (1:9:1) v/v [A] und 50 % Ameisensäure/Trifluorethanol/Chloroform (1:9:1) v/v [B] mittels HPLC und Dünnschichtchromatographie untersucht. Die aus dem HPL-Chromatogramm ermittelten kinetischen Parameter (siehe Abb. 8-10) zeigen, daß die Abspaltung mit 0.1 N Salzsäure/Trifluorethanol-Chloroform (1:9:1) v/v [A] viel rascher abläuft als mit 50 % Ameisensäure/Trifluorethanol/Chloroform (1:9:1) v/v [B].

Die Abspaltung mit 50 Ameisensäure/Trifluorethanol/Chloroform-Gemisch zeigt (a), daß keine Nebenprodukte gebildet werden und (b) die Boc-Gruppe nach 27 h Reaktionszeit noch nicht abgespalten ist. Erst nach 2 Tagen wird ein geringer Teil der Boc-Gruppe entfernt. Dies konnte sowohl mittels HPLC als auch DC nachgewiesen werden.

Bei der Abspaltung mit 0.1 N Salzsäure/Trifluorethanol/Chloroform [A] erfolgt eine vollständige Entfernung der Adpoc-Gruppe nach 57.5 Minuten. Nach 13 h Reaktionszeit werden ca. 3.5 bis 5 % Boc-Gruppe abgespalten. Durch weitere Verfolgung der Reaktion kann festgestellt werden: nach 6, 10, 15 Tage werden 70 %, 92 %, 99 % der Boc-Gruppe abgespalten.

Dieser Versuch zeigt, daß man unter diesen Abspaltungsbedingungen problemlos die Adpoc-Gruppe selektiv und relativ schnell abspalten kann. Fernerhin werden keine Alkylverbindungen, z.B. am Indolring des Tryptophans festgestellt. Das heißt, diese Abspaltungsbedingungen eignen sich sehr gut zur Abspaltung der Adpoc-Gruppe Adpoc-geschützter tryptophanhaltiger Peptide.

In den Abbildungen 9 und 10 sind die HPL-Chromatogramme von Adpoc-Trp-Lys(Boc)-OH nach Behandlung mit den obengenannten Reagenzien dargestellt.

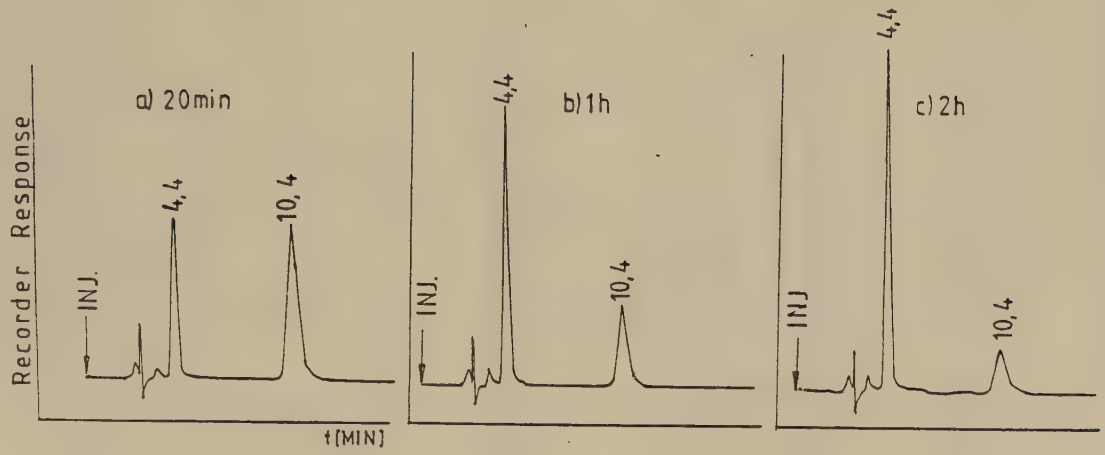


Abbildung 9: HPL-Chromatogramm von Adpoc-Trp-Lys(Boc)-OH während der Abspaltung mit 50 % HCOOH/TFEt/$CHCl_3$ (1:9:1) v/v bei Raumtemperatur
Säule: 4 x 250 mm LiChrosorb RP-18, 7 µm; Elutionsmittel: Methanol/0.1 % Natriumdodecylsulfat (pH 4.0, 85:15); Fließgeschwindigkeit: 1 ml/min; Papiergeschwindigkeit 5 mm/min; Detektion: UV bei 278 nm.

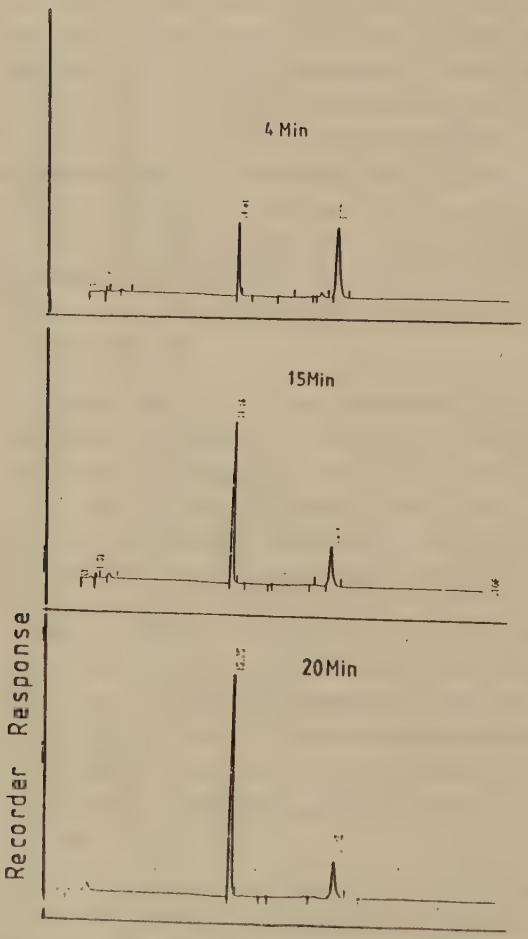


Abbildung 10: HPL-Chromatogramm von Adpoc-Trp-Lys(Boc)-OH nach Behandlung mit 0.1 N HCl/TFEt/$CHCl_3$ (1:9:1) bei Raumtemperatur. Säule: 4 x 250 mm Spherisorb S 3 ODS 2, 3 µm; Eluens A: bid. H_2O, 3 mMol Tetrabutylammoniumchlorid, pH 4.0; Eluens B: 80 % Acetonitril, 20 % bid. H_2O, 3 mMol Tetrabutylammoniumchlorid; Gradient: 0 min, 90 % A, 12 min 0 % A, 20 min 90 % A; Fließgeschwindigkeit: 1 ml/min; Detektion: UV bei 278 nm.

5.5.2. Abspaltung einiger Adpoc-geschützter Aminosäurederivate mit 3 % TFA/CH_2Cl_2

Es wird die Abspaltung der Adpoc-Gruppe von Adpoc-Pro, Adpoc-Leu, Adpoc-Lys(Boc)-OH und Adpoc-Leu-Trp-OH mit 3 % TFA/CH_2Cl_2 bei Raumtemperatur untersucht. Die kinetischen Parameter der untersuchten Substanzen sind in Tabelle 7 zusammengestellt.

Die Ergebnisse zeigen, daß man eine rasche Abspaltung der Adpoc-Gruppe (siehe Abschnitt 3.3), allerdings unter Bildung von Nebenprodukten, erzielen kann. Es zeigt sich, daß sowohl die Adpoc-Gruppe als auch die Boc-Gruppe von Adpoc-Lys(Boc)-OH durch 3 % TFA/CH_2Cl_2 abgespalten wird. Weitere Untersuchungen mit 1 %-, 2 %-TFA/CH_2Cl_2 zeigen keine zufriedenstellende Abspaltungsergebnisse.

Tabelle 7: Spaltungsgeschwindigkeit einiger Adpoc-Aminosäurederivate nach Behandlung mit 3 % TFA/CH_2Cl_2 bei Raumtemperatur.

Verbindung	K · [min^{-1}]	$t_{1/2}$ [min]
Adpoc-Pro-OH	0.257	2.69
Adpoc-Leu-OH	0.55	1.26
Adpoc-Lys(Boc)-OH	0.507	1.36
Adpoc-Leu-Trp-OH	0.054	12.91

5.5.3. Abspaltung der Adpoc-Gruppe von Adpoc-Aminosäuren aromatischer Struktur

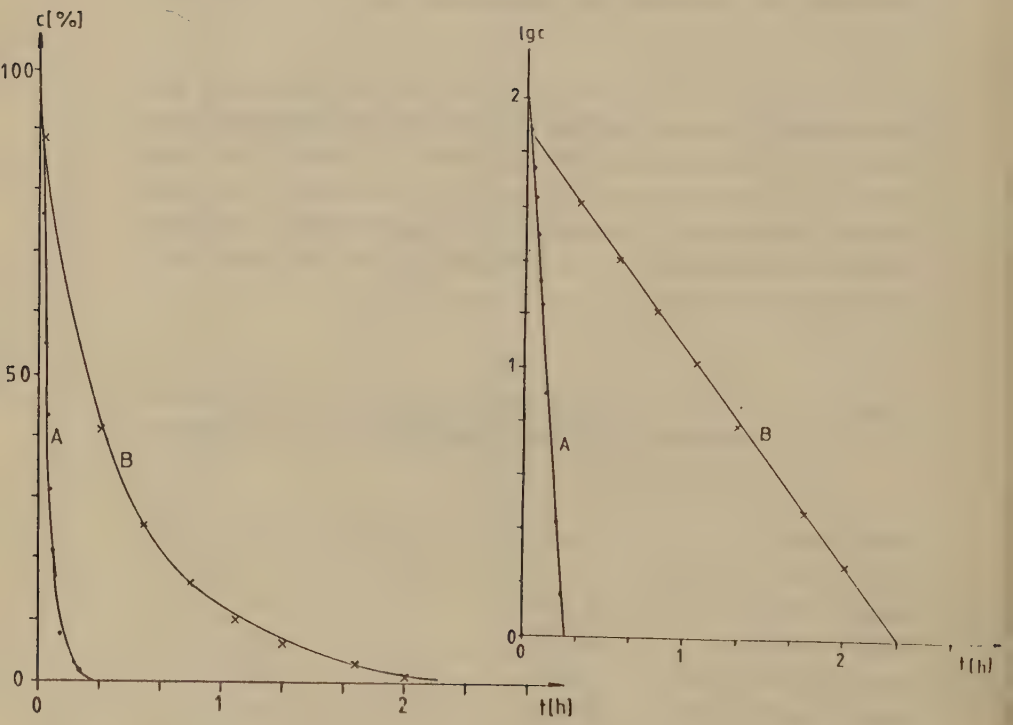


Abbildung 11: Links: Abnahme der Konzentration von Adpoc-Trp-OH nach der Abspaltung mit
A: 0.1 N HCl/TFEt/$CHCl_3$ (1:9:1) v/v und
B: 50 % HCOOH/TFEt/$CHCl_3$ (1:9:1) v/v
bei Raumtemperatur
Rechts: als log c-Zeit-Diagramm graphisch dargestellt.

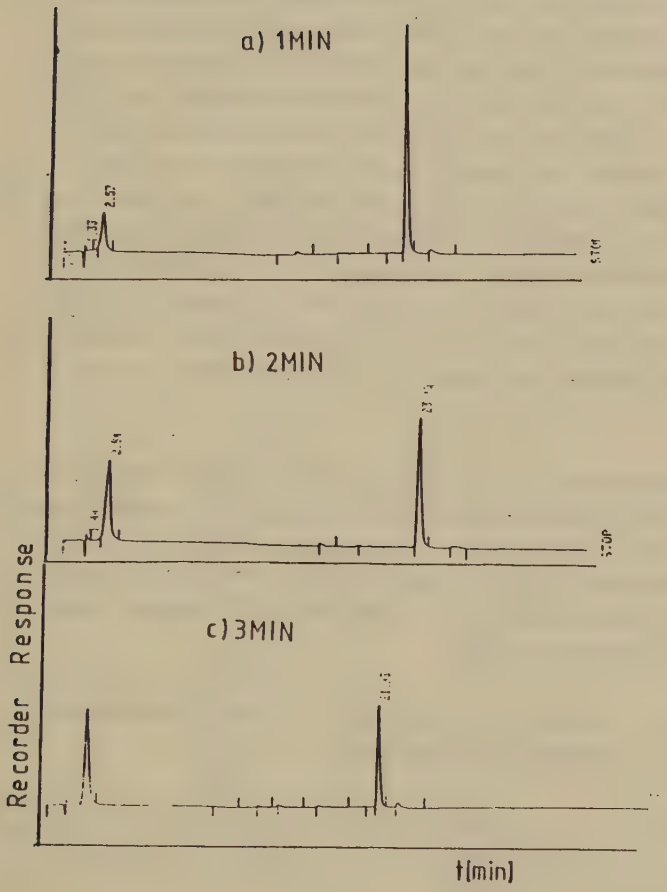


Abbildung 12: HPL-Chromatogramm von Adpoc-Trp-OH nach Behandlung mit 0.1 N HCl/TFEt/$CHCl_3$ (1:9:1) v/v bei Raumtemperatur. Säule: 4 x 125 mm Spherisorb ODS 2, 3 µm; Eluens A: 3 mMol Tetrabutylammoniumchlorid pH 4.0; Eluens B: 80 % Acetonitril, 3 mMol Tetrabutylammoniumchlorid; Gradient: t = 0 min, 90 % A, t = 12 min 0 % A, t = 20 min 90 % A; Fluß: 1 ml/min; Detektion UV bei 278 nm. Der Anteil an freigesetzten H-Trp-OH beträgt bei a) 24.12 %, b) 45.05 %, c) 57.20 %.

Mit diesen Versuchen soll die problemlose Abspaltbarkeit der Adpoc-Gruppe am Beispiel von Adpoc-Trp-OH gezeigt werden. Die Abspaltungsgeschwindigkeiten der Adpoc-Gruppe von Adpoc-Trp-OH wird in zwei verschiedenen Säuregemischen untersucht. Die Konzentration-Zeit-Änderungen sind in Abbildung 11 graphisch dargestellt. Wie die Abbildungen zeigen, gelingt die Abspaltung der Adpoc-Gruppe mit 0.1 N HCl/TFEt/$CHCl_3$ (1:9:1) bei Raumtemperatur innerhalb von 20 Minuten. Das HPL-Chromatogramm (s. Abbildung 12) zeigt, daß keine Nebenprodukte entstehen. Die Abspaltung der Adpoc-Gruppe von Adpoc-Trp-OH mit 50 % HCOOH/TFEt/$CHCl_3$ (1:9:1) verläuft sehr gut aber langsamer. Es werden keinerlei Nebenprodukte festgestellt (s. HPL-Chromatogramm in Abbildung 13).

Die Abspaltung der Adpoc-Gruppe von verschiedenen Adpoc-Aminosäuren aromatischer Struktur mit 0.1 N HCl/TFEt/$CHCl_3$ (1:9:1) wird mittels HPLC untersucht und der Verlauf der Abspaltungen miteinander verglichen. Die aus den HPL-Chromatogrammen ermittelten kinetischen Parameter sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.

Tabelle 8: Kinetische Parameter von Adpoc-Aminosäuren aromatischer Struktur.

Verbindung	Säuregemisch	K·[min^{-1}]	$t_{1/2}$[min]	$t_{99.9\%}$[min]
Adpoc-Trp-OH	a	0.37	2	15
	b	0.026	26.35	140
Adpoc-Tyr(Bzl)OH	a	0.19	3.6	24.0
	b	0.027	25.67	166
Adpoc-Phe-OH	a	0.145	4.78	32.0
	b	0.047	15	73

(a) Abspaltung mit 0.1 N HCl/TFEt/$CHCl_3$ (1:9:1), bei RT
(b) Abspaltung mit 50 % HCOOH/TFEt/$CHCl_3$ (1:9:1), bei RT.

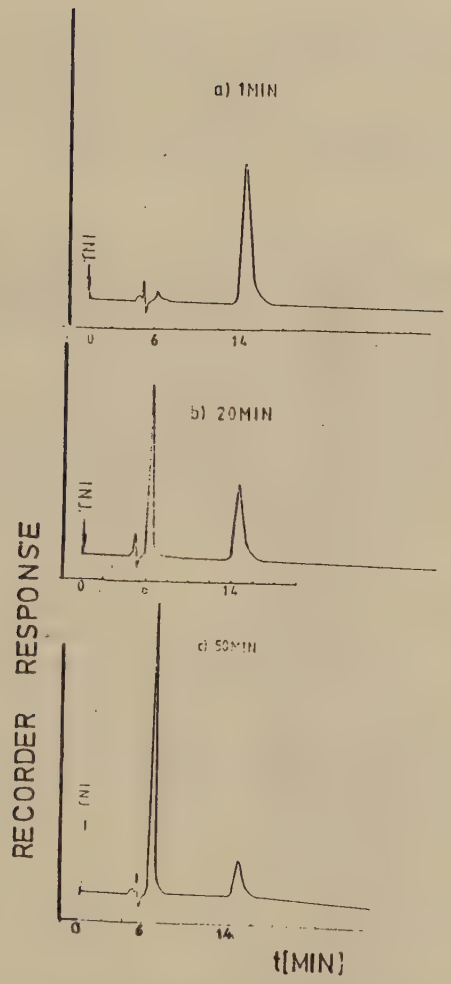


Abbildung 13: HPL-Chromatogramm von Adpoc-Trp-OH in 50 % HCOOH/TFEt/$CHCl_3$ (1:9:1) v/v bei Raumtemperatur. Säule: 4 x 250 mm LiChrosorb RP-18, 5 µm; Fließmittel: 80 % MeOH/1 g Dodecylhydrogensulfat-Natriumsalz, pH 4.0; Fließgeschwindigkeit: 1 ml/min; Papiergeschwindigkeit: 5 mm/min; Detektion: UV bei 278 nm. Der Anteil von freigesetztem H-Trp-OH beträgt bei a) 13 %, b) 58 %, c) 84 % .

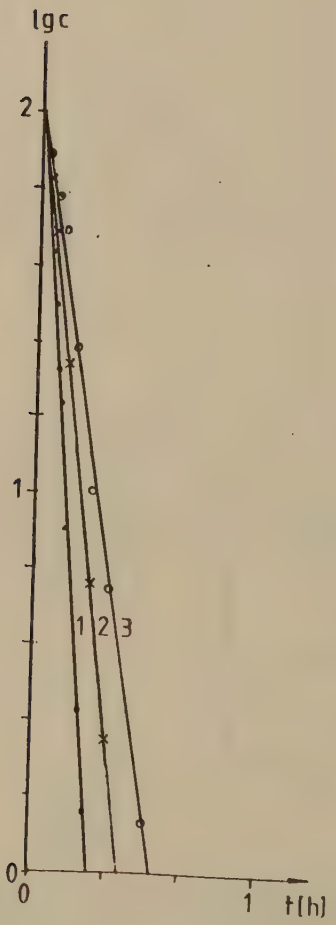


Abbildung 14: lg c/t-Diagramm von verschiedenen Adpoc-Aminosäuren aromatischer Struktur nach Behandlung mit 0.1 N HCl/TFEt/$CHCl_3$ (1:9:1) v/v bei Raumtemperatur. 1: Adpoc-Trp-OH; 2: Adpoc-Tyr(Bzl)OH; 3: Adpoc-Phe-OH.

Die Spaltung der Adpoc-Gruppe gelingt bei allen drei Adpoc-Aminosäuren mittels des Säuregemisches (a) innerhalb von 15 bis 32 Minuten.
Die Benzylgruppe des Tyrosins bleibt während der Abspaltung erhalten.

5.5.4. Abspaltung von Adpoc-Aminosäuren mit basischen funktionellen Gruppen

Um Aussagen über die Spaltungsselektivität der Adpoc-Gruppe in Gegenwart einer N^{ε}-Boc-Gruppe oder N^{ε}-Z-Gruppe des Lysins treffen zu können, wird die selektive Abspaltung der Adpoc-Gruppe von Adpoc-Lys(Boc)-OH bzw. Adpoc-Lys(Z)-OH in verschiedenen Säuregemischen chromatographisch verfolgt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengestellt.

Tabelle 9: Abspaltungsergebnisse von Adpoc-Aminosäuren mit basischen funktionellen Gruppen.

Säuregemisch	Verbindung	Bemerkung
50 % HCOOH/TFEt (1:1(v/v	Adpoc-Lys(Boc)-OH	gute Spaltung der Adpoc-Gruppe. Die Boc-Gruppe bleibt stabil, $t_{1/2}$ = 15 min
80 % HCOOH/TFEt (1:1) v/v		Rasche Abspaltung der Adpoc-Gruppe. Die Boc-Gruppe wird teilweise abgespalten, $t_{99.9\ \%}$ = 3 min
3 % TFA/CH_2Cl_2		Die Boc-Gruppe wird in beträchtlichem Maße abgespalten
2 % TFA/CH_2Cl_2		
1 % TFA/CH_2Cl_2		

Fortsetzung der Tabelle 9.

Säuregemisch	Verbindung	Bemerkung
0.1 N HCl/TFEt/ $CHCl_3$ (1:9:1) v/v	Adpoc-Lys(Z)OH	Selektive Abspaltung der Adpoc-Gruppe, K = 0.16 min^{-1}, $t_{1/2}$ = 4.33 min, $t_{99.9\ \%}$ = 29.6 min
50 % HCOOH/TFEt/ $CHCl_3$ (1:9:1) v/v		Abspaltung verläuft sehr langsam, aber selektiv

5.5.5. Abspaltung von Adpoc-Ala-Lys(Boc)-Leu-OMe [Thymosin β_9 (15-19)]

Die selektive Entfernung des Adpoc-Restes in Gegenwart einer N^{ε}-Boc-Gruppe und eines N^{ε}-Z-Restes der oben genannten Modellpeptide gelingt in 130 Minuten mit 50 % Ameisensäure-Trifluorethanol-Chloroform (1:9:1) bei Raumtemperatur. Dieses Säuregemisch bewährt sich in diesem Versuch als bestes Abspaltungsgreagenz, da keinerlei Nebenreaktionen ablaufen.

Mit 0.1 N HCl/TFEt/$CHCl_3$ (1:9:1) wird die Adpoc-Gruppe des Tripeptids in 30 Minuten abgespalten. Nachteil des Abspaltungsreagenzes ist die Bildung von Nebenprodukten

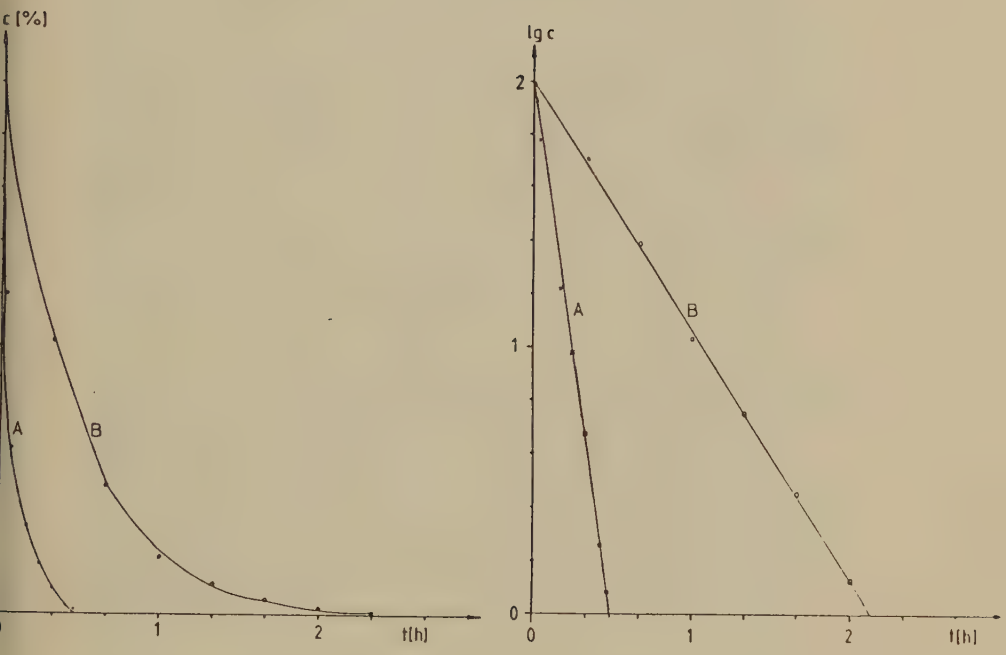


Abbildung 15: Abspaltungskinetik von Adpoc-Ala-Lys(Boc)-Leu-OMe
A: mit 0.1 N HCl/TFEt/$CHCl_3$ (1:9:1),
B: mit 50 % HCOOH/TFEt/$CHCl_3$ (1:9:1) bei RT.
Links: Konzentration-Zeit-Diagramm,
rechts: lg c/t-Diagramm.

5.5.6. Abspaltung von tryptophanhaltigen Adpoc-Dipeptiden

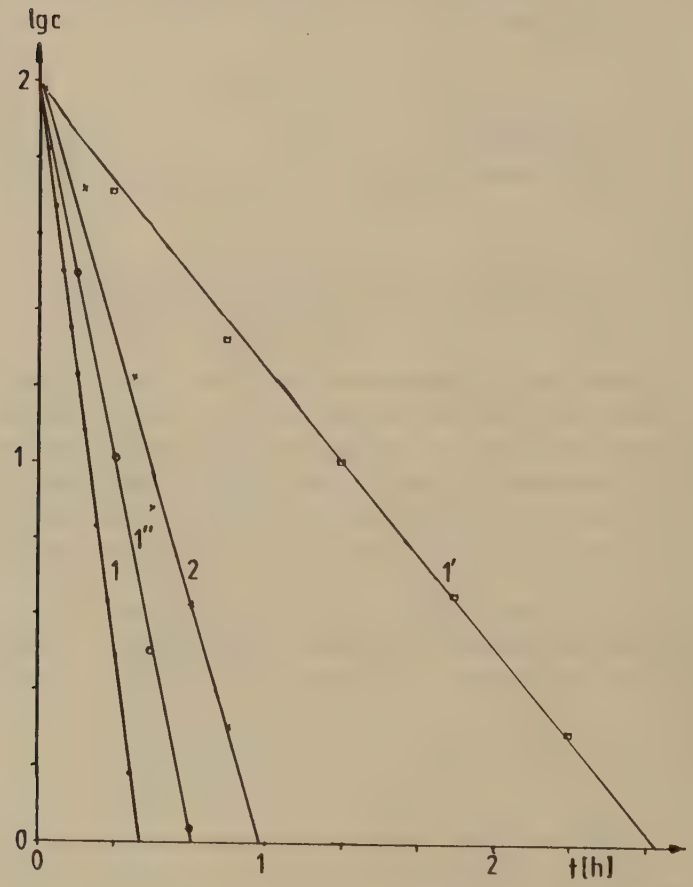


Abbildung 16: lg c/t-Diagramm von Adpoc-Dipeptiden: 1: Abspaltung von Adpoc-Leu-Trp-OMe mit 0.1 N HCl/TFEt/$CHCl_3$ (1:9:1) v/v bei RT; 1': Abspaltung von Adpoc-Leu-Trp-OMe mit 50 % HCOOH/TFEt/$CHCl_3$ (1:9:1) v/v bei RT; 2: Abspaltung von Adpoc-Leu-Trp-OH mit 0.1 N HCl/TFEt/$CHCl_3$ (1:9:1) v/v bei RT 1'': Abspaltung von Adpoc-Leu-Trp-OMe mit 50 %

Der Versuch die Adpoc-Gruppe von Adpoc-Leu-Trp-OMe mittels Salzsäure/Trifluorethanol/Chloroform abzuspalten, gelingt innerhalb von 26 Minuten. Jedoch kann man auf der DC-Platte kleine nicht identifizierbare Flecken, die mit Ninhydrin nicht anfärbbar sind und im UV-Licht nicht detektierbar sind, aber eine schwach blaue Farbe mit Chlortolidin zeigen, feststellen. Diese Beobachtungen werden bei der Spaltung der Adpoc-Gruppe des gleichen Peptids mit 50 % Ameisensäure-Trifluorethanol-Chloroform nicht festgestellt. Dieses Säuregemisch spaltet die Adpoc-Gruppe spezifisch aber sehr langsam ab. Erhöht man die Säuremenge auf das Verhältnis 1:3 (d.H. 50 % HCOOH/TFEt (1:3)), so kann man die Adpoc-Gruppe von Adpoc-Leu-Trp-OMe innerhalb 40 Minuten chromatographisch spezifisch abspalten. Dieses Säuregemisch führt zu erheblicher Verkürzung der Reaktionszeit (s. Abbildung 16, Kurven 1' und 1''). Weiterhin kann durch die Referenzverbindung gezeigt werden, daß die Carboxymethylgruppe nicht abgespalten wird.

Im Falle von Adpoc-Leu-Trp-OH ist die Abspaltung mittels Salzsäure/Trifluorethanol/Chloroform (1:9:1) v/v günstiger. Mit diesem Säuregemisch gelingt eine vollständige Abspaltung der Adpoc-Gruppe von Adpoc-Leu-Trp-OH in einer Stunde. Bei Verwendung von 50 % HCOOH/TFEt/$CHCl_3$ (1:9:1) zur Abspaltung der Adpoc-Gruppe von Adpoc-Leu-Trp-OH dauert die Spaltung 2 h. Es werden keine Nebenreaktionen festgestellt.

5.5.7. Abspaltung von Adpoc-Leu-Trp-Met-OH

Unter Bildung geringer Mengen an Nebenprodukten kann die Adpoc-Gruppe von Adpoc-Leu-Trp-Met-OH in 45 Minuten völlig abgespalten werden.

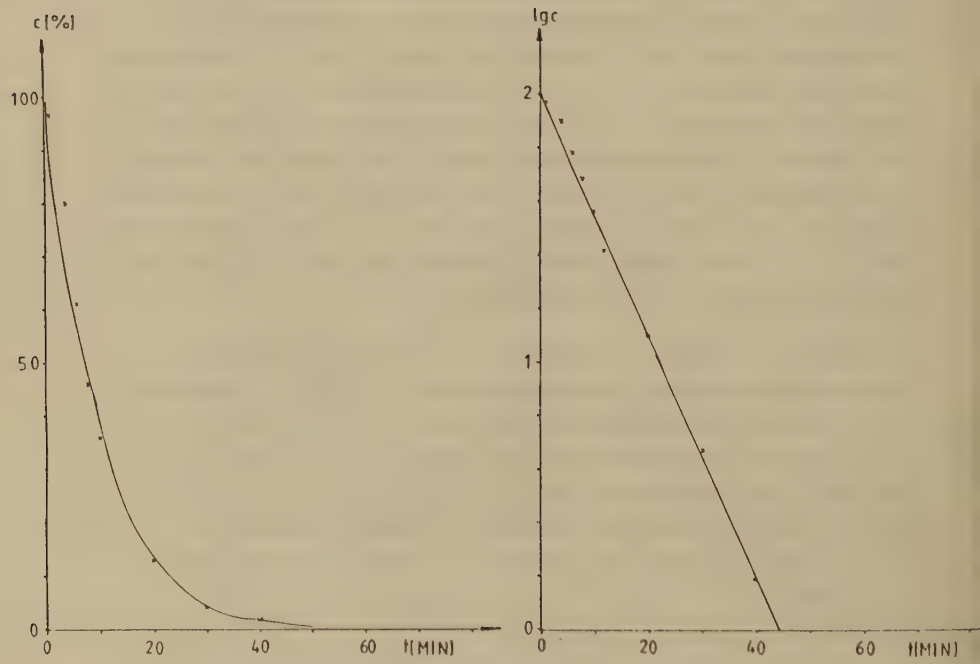


Abbildung 17: Abspaltungskinetik von Adpoc-Leu-Trp-Met-OH mit 0.1 N HCl/TFEt/$CHCl_3$ (1:9:1) v/v bei Raumtemperatur.
Links: Konzentration-Zeit-Diagramm,
rechts: lg c/t-Diagramm.

Verwendet man das Ameisensäuregemisch zur Abspaltung des Adpoc-Restes von Adpoc-Leu-Trp-Met-OH, so dauert die Abspaltung einige Stunden. Trotz spezifischer Spaltung mittels 50 % Ameisensäure-Trifluorethanol-Chloroform, ist dieses Reagenz unbefriedigend, da es zu lange Abspaltungszeiten erfordert.

5.5.8. Kinetische Parameter der Abspaltungsversuche

Die Auswertung mehrerer Messungen haben gezeigt, daß die Abspaltung nach einer Reaktion 1. Ordnung verläuft. Die Ergebnisse der Abspaltungsversuche sind in der Tabelle 10 zusammengestellt.

Tabelle 10: Kinetische Parameter der Modellverbindungen
a = 0.1 N HCl/TFEt/$CHCl_3$ (1:9:1) v/v bei RT
b = 50 % HCOOH/TFEt/$CHCl_3$ (1:9:1) v/v bei RT.

Verbindung	Reagenz	K·[min^{-1}]	$t_{1/2}$[min]	$t_{99.9\%}$[min]
Adpoc-Trp-OH	a	0.37	2.0	15
	b	0.026	26.35	140
Adpoc-Phe-OH	a	0.145	4.78	32
	b	0.047	15.0	73
Adpoc-Tyr(Bzl)-OH	a	0.19	3.6	24
	b	0.027	25.67	166
Adpoc-Lys(Z)-OH	a	0.16	4.33	29.6
	b	0.024	28.8	190
Adpoc-Lys(Boc)-OH	a	0.173	4.0	26.62
Adpoc-Trp-Lys(Boc)-OH	a	0.08	8.66	57.5
	b	0.013	53.3	320

Fortsetzung von Tabelle 10.

Verbindung	Reagenz	$K \cdot [min^{-1}]$	$t_{1/2}$ [min]	$t_{99.9\%}$ [min]
Adpoc-Leu-Trp-OH	a	0.085	8.15	57
	b	0.0265	26.0	120
Adpoc-Leu-Trp-OMe	a	0.17	4.08	26
	b	0.026	26.7	163
Adpoc-Leu-Trp-Met-OH	a	0.10	6.93	45
Adpoc-Leu-Pro-OMe	a	0.10	7.0	41
Adpoc-Ala-Lys(Boc)-Leu-OMe	a	0.15	4.6	30
	b	0.036	19.25	130
Adpoc-Asn-NH_2	a	0.03	23.1	148
Adpoc-Ala-OH	a	0.038	18.24	120
Adpoc-Leu-OH	a	0.028	24.75	150

5.6. Zur Differentialthermoanalyse (DTA)

Die Differentialthermoanalyse ist eine Methode, die es gestattet, aus einem Experiment die Aktivierungsparameter bzw. kinetische Parameter der untersuchten Reaktion zu bestimmen [77]. Bisher können auf dieser Weise nur einfache Reaktionen quantitativ behandelt werden. Chemische Abbaureaktionen fester Substanzen lassen sich mit DTA-Diagrammen korrelieren. Es wird die thermische Stabilität folgender Aminosäuren und Aminosäurederivaten untersucht: Glycin, Tryptophan, Boc-Trp-OH, Adpoc-Trp-OH, Boc-Gly-OH und Adpoc-Gly-OH.

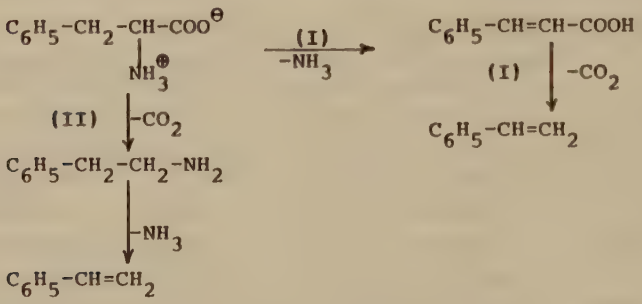
Aus den DTA-Diagrammen (siehe Abbildungen 18-23) läßt sich feststellen, ob die Vorgänge endotherm oder exotherm ablaufen. Die Enthalpien der Abbauprozesse sind in der Tabelle 11 zusammengestellt.

Tabelle 11: Ergebnisse der DTA.

Verbindungen	Temperatur-bereich [°C]	T_{max} [°C]	Enthalpie [J/g]	Art der Reaktion
Trp-OH	274-294	285	355.25	endotherm
Boc-Trp-OH	98-122	110.5	20.67	endotherm
	125-143	136.5	48.58	endotherm
	150-162	161.5	-16.50	exotherm
	254-290	275	210.83	endotherm
Adpoc-Trp-OH	101-125	115	88.14	endotherm
	125-137	130	-21.88	exotherm
	257-299	281.5	182.82	endotherm
Gly-OH	234-268	252	976.88	endotherm
Boc-Gly-OH	80- 95	89	131.2	endotherm
	132-138	134.5	-7.95	exotherm
	215-257	243	263.88	endotherm
Adpoc-Gly-OH	160-194	182	290.76	endotherm
	226-260	248.5	238.16	endotherm

Die Resultate zeigen, daß bei Boc-Trp-OH vier Abbaureaktionen (3 endotherm, 1 exotherm) stattgefunden haben, wobei für Adpoc-Trp-OH nur zwei endotherme und eine exotherme Reaktionen ablaufen. Bei Boc-Gly-OH sind drei Zerfallreaktionen (1 exotherm, 2 endotherm) festzustellen. Adpoc-Gly-OH dagegen zeigt nur zwei endotherme Reaktionen.

Das Temperaturmaximum der zweiten endothermen Reaktion von Boc-Trp-OH stimmt mit dem Schmelzpunkt von Boc-Trp-OH überein. Ebenso stimmen die ersten Temperaturmaxima von Adpoc-Trp-OH, Boc-Gly-OH und Adpoc-Gly-OH mit deren Schmelzpunkten überein.
Hung [78] formulierte 1977 folgende Zerfallsreaktionen für die Differentialthermoanalyse von Phenylalanin:



Es sollten mittels DTA kinetische Parameter kristalliner Aminosäurederivaten gewonnen werden. Um kinetische Daten solcher Zerfallsreaktionen zu ermitteln, müssen mittels DTA kristalline Substanzen bei verschiedenen Heizraten untersucht werden [78-82].

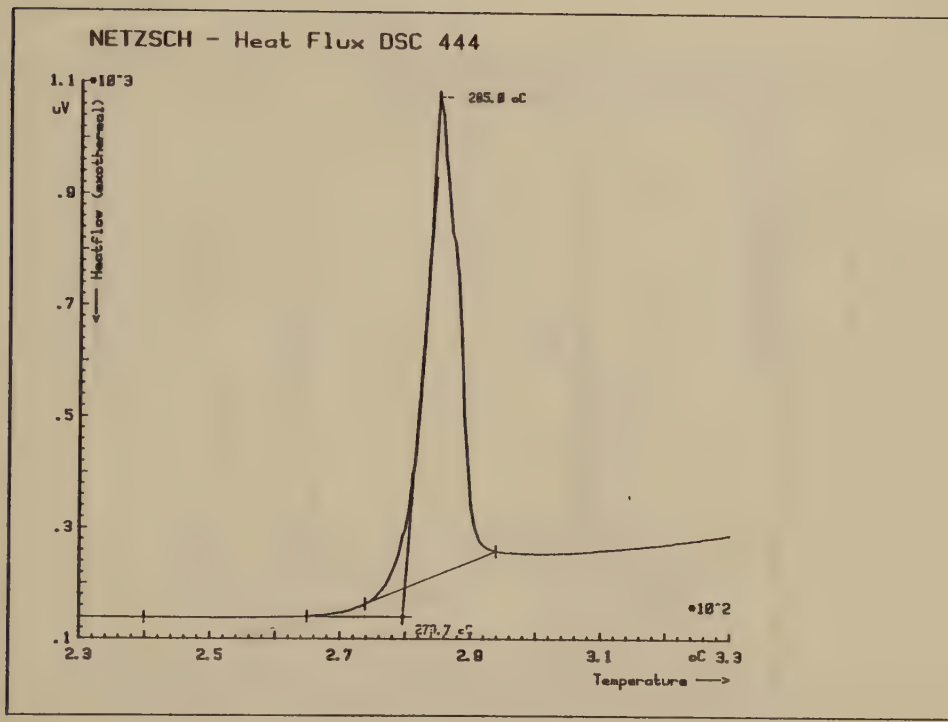


Abbildung 18: Differentialthermoanalyse von Tryptophan.
Einwaage: 12.6 mg
Referenz: -
Atmosphäre: Helium
Heizrate: 5 K/min
Basislinie: 274-294^{o}C, Enthalpie: 355.25 J/g.

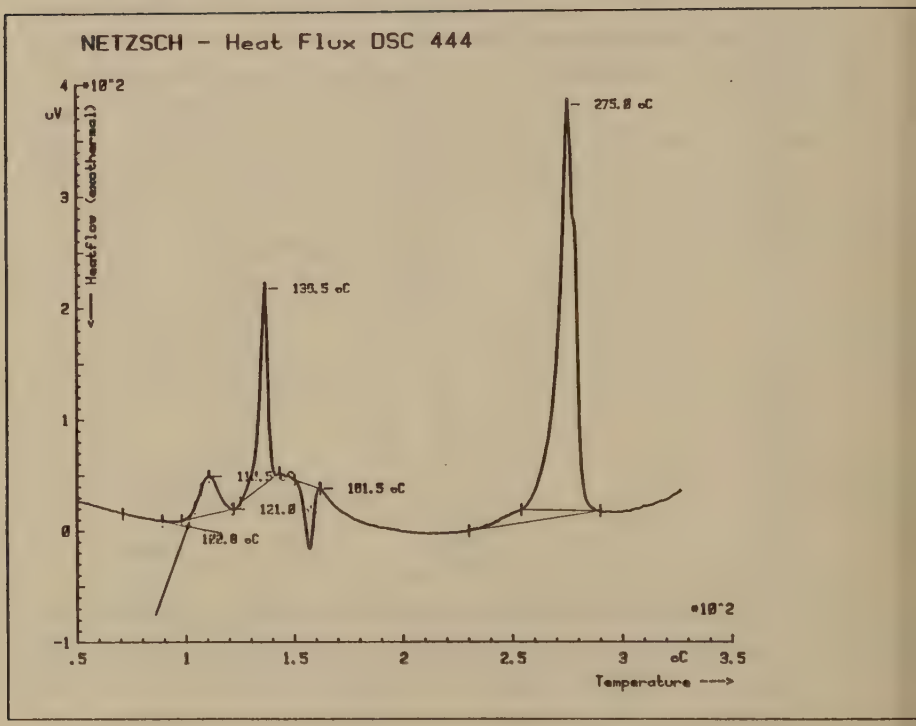


Abbildung 19: Differentialthermoanalyse von Boc-Trp-OH.
Einwaage: 13.8 mg
Referenz: -
Atmosphäre: Helium
Heizrate: 5 K/min

1) Basislinie: 230-290°C, Enthalpie: 231.51 J/g
2) Basislinie: 254-290°C, Enthalpie: 210.83 J/g
3) Basislinie: 98-122°C, Enthalpie: 20.67 J/g
4) Basislinie: 150-162°C, Enthalpie: -16.50 J/g
5) Basislinie: 125-143°C, Enthalpie: 48.58 J/g.

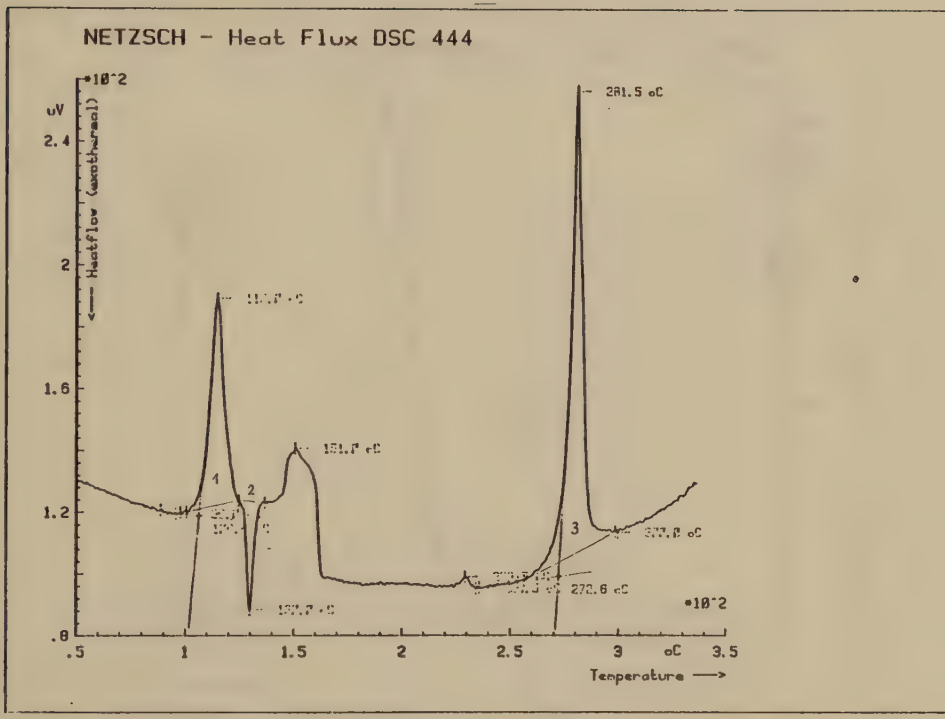


Abbildung 20: Differentialthermoanalyse von Adpoc-Trp-OH.
Einwaage: 4.9 mg
Referenz: Kieselgur
Atmosphäre: Helium
Heizrate: 5 K/min

1) Basislinie: 101-125°C, Enthalpie: 88.14 J/g
2) Basislinie: 125-137°C, Enthalpie: -21.88 J/g
3) Basislinie: 257-299°C, Enthalpie: 182.82 J/g.

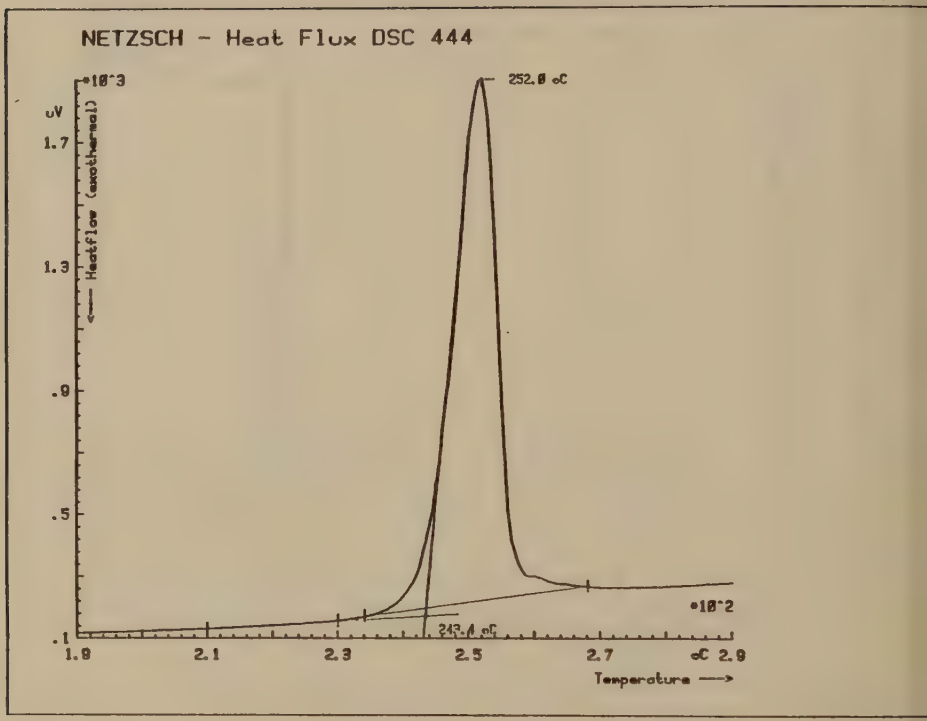


Abbildung 21: Differentialthermoanalyse von Glycin.
Einwaage: 12.1 mg
Referenz: Kieselgur
Atmosphäre: Helium
Heizrate: 5 K/min
Basislinie: 234-268^{O}C, Enthalpie: 976.88 J/g.

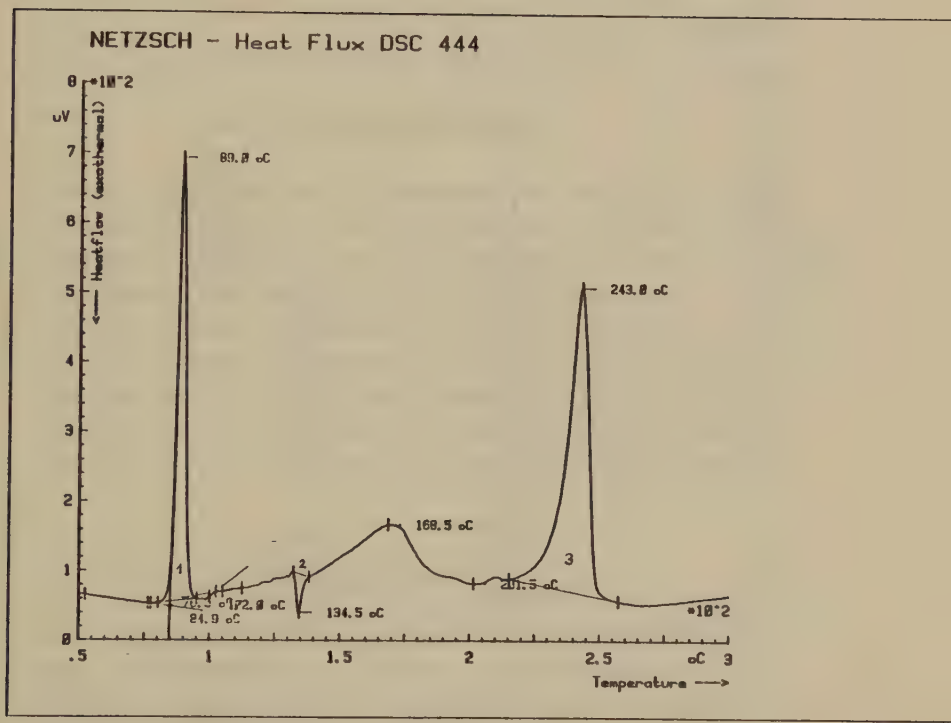


Abbildung 22: Differentialthermoanalyse von Boc-Gly-OH.
Einwaage: 14.6 mg
Referenz: Kieselgur
Atmosphäre: Helium
Heizrate: 5 K/min
1) Basislinie: 80- 95°C, Enthalpie: 131.12 J/g
2) Basislinie: 132-138°C, Enthalpie: -7.95 J/g
3) Basislinie: 215-257°C, Enthalpie: 263.88 J/g.

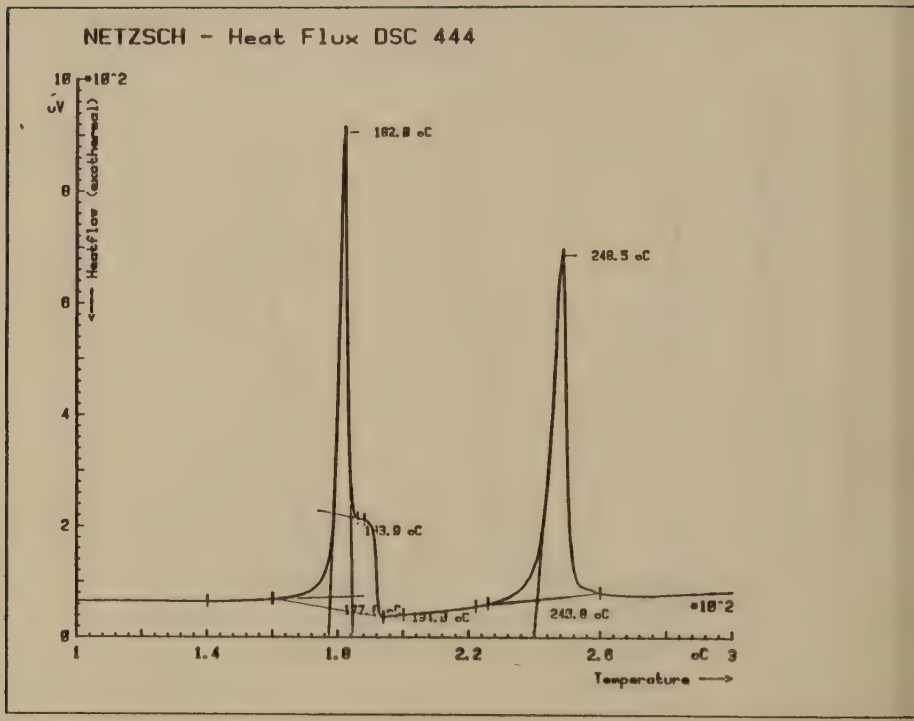


Abbildung 23: Differentialthermoanalyse von Adpoc-Gly-OH.
Einwaage: 13.1 mg
Referenz: Kieselgur
Atmosphäre: Helium
Heizrate: 5 K/min
1) Basislinie: 160-194°C, Enthalpie: 290.76 J/g
2) Basislinie: 226-260°C, Enthalpie: 238.16 J/g.

6. EXPERIMENTELLER TEIL

6.1. Spektroskopische Methoden

6.2. Kernresonanzspektroskopie

Die Aufnahme der PFT-^{13}C-NMR-Spektren erfolgt mit einem Bruker HFX-Multikerngerät (22.628 MHz) und einem WP-80-NMR-Spektrometer (20.115 MHz) ebenfalls von der Fa. Bruker, Karlsruhe. Die Spektren werden durch Akkumulation von ^{13}C-Impulsinterferogrammen (2-3.5 µ; 0.4 sec/scan) und anschließender Fouriertransformation (BNC-28-Rechner) des akkumulierten Interferogramms erhalten. Es werden ungefähr 150-300 mg der zu messenden Substanz in jeweils 1.0-2.0 ml des entsprechenden Lösungsmittels aufgelöst.

6.3. Massenspektrometrie

Die Felddesorptionsmassenspektren werden mit einem Gerät MAT 711 der Fa. Varian, Bremen, unter Verwendung einer FD-Ionenquelle gemessen. Die Temperaturen sind in den einzelnen Massenspektren angegeben.

6.4. Drehwerte

Die Drehwerte wurden mit einem Zeiss OLD-5-Polarimeter bei 578, 546, 436, 405 und 365 nm gemessen. Die $[\alpha]_D$-Werte werden durch graphische Extrapolation ermittelt. Ein Teil der Drehwerte wird auf einem Perkin-Elmer 141 Polarimeter gemessen, wobei der $[\alpha]_D$-Wert direkt abgelesen werden kann.

6.5. Chromatographische Methoden

Alle dargestellten Verbindungen werden mittels Dünnschichtchromatographie unter Verwendung von DC-Fertigplatten der Fa. Merck, Darmstadt (Kieselgel 60 F_{254}, auf Glas) auf Einheitlichkeit überprüft. Folgende Fließmittelsysteme fanden Verwendung:

A:	n-Butanol/Eisessig/Wasser	3:1:1
B:	n-Butanol/Eisessig/Wasser	2:1:1
C:	Chloroform/Methanol	98:2
D:	Chloroform/Methanol/Benzol/Wasser	8:8:8:1
E:	Chloroform/Methanol	8:2
F:	n-Butanol/Eisessig/Pyridin/Wasser	5:1:5:4
G:	Chloroform/Methanol/Essigsäure/Wasser	60:45:6:14
H:	Hexan/tert.-Butanol/Wasser	3:2:1

Die Chromatogramme werden in einer Kammer mit Ninhydrinlösung [99,100] oder Chlor-Tolidin-Lösung [101] entwickelt.

6.6. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Für die Untersuchungen werden ein Integrator vom Typ 3390A der Fa. Hewlett-Packard und ein Zweikanalschreiber der Fa. Knauer eingesetzt. Als Gradientenformer und Konstantenflußpumpe werden das Modell M2500 (Gynkotek,München) bzw. eine Twincle Pumpe (Jasco, Tokyo) verwendet.

Die Probenaufgabe erfolgt mit der 25 µl HPLC-Spritze der Firma Univemetrics Universal Corporation (USA).

Die Detektion geschah mit dem variablen Wellenlängen-UV-Detektor, UVIDEC-100-III, UV-Spektrophotometer der Fa. Jasco (Tokyo, Japan).

Chromatographische Elutionsmittel

Die Elutionsmittel sind mit weiteren Parametern bei den einzelnen Abbildungen angegeben. Vor Gebrauch werden die mit bidestilliertem Wasser hergestellten Elutionsmittel filtriert und einige Minuten unter Rühren am Wasserstrahlvakuum, im Ultraschallbad (kurz) oder durch Einleitung von Helium entgast.

Säulenfüllung

3.0 g LiChrosorb RP 18 (7 µm, Fa. Merck, Darmstadt) werden unter Rühren in 15 ml Toluol suspendiert und 2 Minuten mit Ultraschall behandelt. Dann gibt man zu dieser Suspension 20 ml Cyclohexanol (pA) und behandelt noch einmal 5 Minuten im Ultraschallbad. Die so vorbehandelte Suspension wird in das Füllrohr (schnell!) gegossen und das Säulenmaterial durch Pumpen von n-Hexan (500 ml) mit maximal erreichbarem Druck in die Trennsäule gepresst. Die Berechnung der theoretischen Bodenzahl (n) erfolgt nach [86]:

$$n = 5.54 \, (t_R/W_{1/2})^2$$

wobei t_R = Retentionszeit und
$W_{1/2}$ = Peakbreite in halber Höhe.

Naßfüllen

3.0 g (ca. 10 % über dem tatsächlichen Bedarf) LiChrosorb RP 18 (5 µm, Fa. Merck, Darmstadt) werden in Tetrachlorkohlenstoff/Hexan/Dioxan (2:1:1) aufgeschlämmt und 5 bis 10 Minuten im Ultraschallbad geschüttelt. Danach gießt man die Suspension rasch in das Füllrohr und das Füllmaterial wird durch Pumpen von 200 ml "Slurry"-Lösung mit maximal erreichbarem Druck in die Trennsäule gepreßt.

6.7. Sonstige Geräte

Zur Bestimmung der Differentialthermoanalyse findet ein Gerät der Firma NETSCH-Heat flux DSC 444 Verwendung.

Die Schmelzpunkte werden auf einer Schmelzpunktsbestimmungsapparatur nach Dr. Tottoli der Fa. Büchi, Flawill, Schweiz gemessen und sind nicht korrigiert. Zur Messung der pH-Werte dient eine Gerätekombination (pH-Meter E 512 und Impulsomat E 473) der Fa. Netrohm, Bad Herisau, Schweiz.

6.8. Chemikalien

Die Lösungsmittel werden nach üblichen Vorschriften [83] getrocknet und anschließend über eine 140 cm Vigreux-Kolonne unter Feuchtigkeitsausschluß destilliert. Die Aufbewahrung der Lösungsmittel erfolgt über einem Molekularsieb (Fa. Merck, Darmstadt, 3 bzw. 4 Å). Die in dieser Arbeit verwendeten Aminosäuren sind Produkte der Fa. Merck, Darmstadt,und haben L-Konfiguration.

Adamantancarbonsäure wurde von der Fa. Bachem, Bubendorf, Schweiz, N-Hydroxysuccinimid von der Fa. Senn-Chemicals, Dielsdorf, Schweiz und 1-Hydroxybenzotriazol von der Fa. Fluka, Buchs, Schweiz, bezogen.

Folgende Ausgangsverbindungen werden nach Literaturangaben synthetisiert: tert-Butyloxycarbonylazid (Boc-azid) aus Carbazinsäure-tert-butylester und Natriumnitrit in Eisessig [84], Benzyloxycarbonylchlorid aus Benzylalkohol und Phosgen [85].

Zur Berechnung der Molekulargewichte werden folgende Atomgewichte verwendet: C = 12.011, H = 1.009, Cl = 35.453, F = 18.998, O = 15.999 und S = 32.064.

6.9. Synthese der Adpoc-Aminosäuren über den Fluorameisensäure-2-adamantyl(1)-propyl(2)-ester (Adpoc-F)

6.9.1. Adamantancarbonsäureethylester

In einem 2 l Dreihalskolben mit KPG-Rührer, Thermometer, Tropftrichter und $CaCl_2$-Rohr versehen, werden 1.3 l absol. Ethanol gebracht. Man kühlt die Lsg. auf -10° ab und tropft bei dieser Temperatur innerhalb 1 Std. die berechnete Menge Thionylchlorid (frisch destilliert) zu, wobei die Temperatur nicht über -5° steigen soll. Anschließend wird zu dieser Lösung 0.4 Mol Adamantancarbonsäure gegeben. Man läßt über Nacht rühren. Nach Beendigung der Reaktion wird das Reaktionsgemisch auf dem Wasserbad am Rotationsverdampfer eingeengt. Der so erhaltene Adamantancarbonsäureethylester wird im Vakuum fraktioniert destilliert.

Ausbeute: 67 g (68.41 %)

$Kp_{0.8}$ = 88-90°C (Lit. $Kp_{0.8}$ = 89-90°C) [7]

Rf_D: 0.63 (Methanol/Chloroform/Benzol/Wasser 8:8:8:1)

$C_{13}H_{20}O_2$ (208.31)	Ber.	C 74.96	H 9.68
	Gef.	C 75.86	H 10.07

6.9.2. Adamantancarbonsäuremethylester

Der Methylester wird nach Zitat [87] aus Adamantancarbonsäure, Thionylchlorid und Methanol hergestellt.

Ausbeute: 92.25 g (95 %)

Fp.: 38-40°C

$C_{12}H_{18}O_2$ (194.27)	Ber.	C 74.19	H 9.34
	Gef.	C 73.77	H 9.42

6.9.3. 2-(1-Adamantyl)-propanol-2

In einem 2 l Dreihalskolben, der mit Rückflußkühler, Rührwerk und Tropftrichter versehen ist, werden 2.6 Mol Magnesiumspäne mit trockenem Ether gerade bedeckt. Hierzu setzt man 8.1 ml Methyljodid zu. Nach Einsetzen der Reaktion und bei beginnendem Sieden des Ethers wird nun die restliche Menge Methyljodid (153.83 ml), in 300 ml Ether gelöst, langsam unter Rühren zugetropft, wobei der Ether gelinde beim Sieden gehalten wird. Falls die Mischung zu heftig reagiert, wird die Lösung abgekühlt. Gegen Ende der Reaktion wird auf dem Wasserbad bei 60°C so lange erhitzt, bis sich fast alles Magnesium gelöst hat. Die so hergestellte Grignard-Lösung wird abgekühlt und dann werden 170 g Adamantancarbonsäuremethylester, in 350 ml absol. Ether gelöst, innerhalb 2 Std. zugetropft. Anschließend wird das Reaktionsgemisch auf dem Wasserbad bei 40°C 2 Std. erhitzt. Man läßt über Nacht weiter reagieren. Nach Beendigung der Reaktion wird das Gemisch auf Eis gegossen und mit 1 N HCl auf pH 4 angesäuert.

Die organische Phase wird abgetrennt und die wäßrige Phase noch dreimal ausgeethert. Die vereinigten Etherphasen werden abwechselnd 3 mal mit 10 %iger Na_2CO_3-Lösung und Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Abtrennung des Natriumsulfats wird am Rotationsverdampfer eingeengt. Das Produkt wird aus Ether kristallisiert.

Ausbeute: 178.5 g (92 % d. Theorie)

Fp.: 78-79°C (Lit. Fp.: 78-80°C) [7]

$C_{12}H_{18}O_2$ (194.27)	Ber.	C 80.35	H 11.41
	Gef.	C 79.63	H 11.65

6.9.4. Fluorameisensäure-2-(1-adamantyl)-propyl(2)-ester (Adpoc-F)

Zu 97 g (0.5 Mol) 2-(1-Adamantyl)-propanol-2 in 1.4 l absol. Ether und 80 ml Triethylamin wird trockenes SO_3-freies Carbonylchloridfluorid (hergestellt aus 300 ml 60 %igem Oleum und 100 ml Trichlorfluormethan (Frigen 11) nach Zitat [88,89]) bei -30° direkt einkondensiert. Dabei fällt Triethylammoniumhydrochlorid aus. Nach Beendigung der Gasentwicklung läßt man das Gemisch auf Zimmertemperatur erwärmen und verdrängt das überschüßige Fluorphosgen mit Stickstoff. Man trennt das ausgefallene Ammoniumsalz von der Lösung und wäscht mehrmals mit Ether. Die Etherextrakte werden vereinigt und eingeengt. Dabei kristallisiert das Produkt aus.
Ausbeute: 98.73 g (82 %)
Fp.: 52-54°C (Lit.: Fp.: 52°C) [90]

6.9.5. N^{α}-[1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl]-L-leucin (Adpoc-Leu-OH)

Zu 0.025 Mol Leucin, 0.025 Mol $NaHCO_3$ und 2.65 g Na_2CO_3 werden 50 ml H_2O/35 ml Dioxan gegeben (klare Lösung). Diese Lösung wird auf 0° gekühlt und dann werden 7.08 g (0.029 Mol) Adpoc-F, gelöst in wenig Dioxan, zugetropft. Falls ein Niederschlag ausfällt, kann man durch Zugabe von Ether den Niederschlag auflösen. Nach Zutropfen des Adpoc-F läßt man die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur erwärmen und rührt über Nacht weiter.

Nach vollständiger Umsetzung wird das Dioxan weitgehend im Vakuum abgedampft und nach 3-maliger Extraktion mit Ether (Etherphase verwerfen !) unter Eiskühlung mit Essigester überschichtet. Man säuert mit verd. H_3PO_4 auf pH 3 an. Nach Trennen der Phasen wird die wäßrige Phase noch

2 mal mit Essigester ausgeschüttelt. Man vereinigt die Essigesterphasen, wäscht mit H_2O und läßt die Lösung über Na_2SO_4 trocknen. Nach Entfernung des Lösungsmittels bei 30°C im Vakuum, wird der Rückstand aus Ether/n-Hexan umkristallisiert.

Ausbeute: 8.5 g (97 %)

Rf_D: 0.84 (Methanol/Chloroform/Benzol/Wasser 8:8:8:1)

Fp.: 180-181°C (Lit. Fp.: 176°C) [7]

$[\alpha]_D^{22}$: -12.05 (c = 1.0, MeOH), Lit. $[\alpha]_D^{23}$: -12.8 (c = 1, MeOH) [7]

$C_{20}H_{33}NO_4$ (351.49)	Ber.	C 68.34	H 9.46	N 3.98
	Gef.	C 67.72	H 9.89	N 3.94

6.9.6. N^{α}-[1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl]-L-leucin-N-hydroxysuccinimidester (Adpoc-Leu-OSu)

3.51 g (10 mMol) Adpoc-Leu-OH und 1.15 g (10 mMol) N-Hydroxysuccinimid werden in 40 ml Dioxan/10 ml Acetonitril bei Raumtemperatur gelöst. Nach Abkühlung auf -10°, werden 3.06 g Dicyclohexylcarbodiimid, gelöst in 12 ml Dioxan, zugetropft. Man läßt die Mischung bei dieser Temperatur 1 Std. lang nach beendetem Zutropfen des Dicyclohexylcarbodiimids reagieren. Dabei fällt der DCC-Harnstoff aus. Das Reaktionsgemisch läßt man auf Zimmertemperatur erwärmen und rührt weiter über Nacht. Nach Beendigung der Umsetzung wird das DCCH-Salz abgetrennt und das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird in Diisopropylether auskristallisiert.

Ausbeute: 4.03 g (90 %)

Fp.: 140-141°C

Rf_D: 0.73 (Methanol/Chloroform/Benzol/Wasser 8:8:8:1)

$[\alpha]_D^{20-25}$: -34.3° (c = 0.98, MeOH)

$C_{24}H_{36}N_2O_6$ (448.566)	Ber.	C 64.26	H 8.09	N 6.25
	Gef.	C 64.06	H 8.15	N 6.23

6.9.7. N^{α}-[1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl]-L-leucyl-tryptophan (Adpoc-L-Leu-L-Trp-OH)

1.02 g L-Tryptophan und 0.42 g $NaHCO_3$ werden in 10 ml 0.5 N NaOH, wenig H_2O und 15 ml Dimethylformamid gelöst. Die Lösung wird auf 0° gekühlt und die berechnete Menge (2.42 g) Adpoc-Leu-OSu, gelöst in 45 ml Dimethylformamid, zugetropft. Dabei soll die Temperatur nicht über $0^{\circ}C$ steigen. Nach Beendigung des Zutropfens läßt man auf Zimmertemperatur erwärmen und rührt weiter über Nacht. Es fällt ein weißer Niederschlag aus.

Nach vollständiger Umsetzung wird der Niederschlag entfernt und die Lösung im Vakuum bei $40^{\circ}C$ eingeengt. Beim Ansäuern mit 10 %iger Citronensäure auf pH 4 wird durch Zugabe von H_2O das Produkt ausgefällt.
Ausbeute: 2.08 g (80 %)
Fp.: 185-186°C
Rf: 0.69 (Methanol/Chloroform/Benzol/Wasser 8:8:8:1)
$[\alpha]_D^{22}$: +7.1° (c = 1, MeOH)

$C_{31}H_{43}N_3O_5$ (537.685)	Ber.	C 69.25	H 8.06	N 7.81
	Gef.	C 68.98	H 8.09	N 7.75

6.9.8. Herstellung von Methioninmethylesterhydrochlorid (Met-OMe·HCl)

Zu 1.08 l absol. Methanol gibt man bei -10° unter Rühren 150 ml frisch destilliertes Thionylchlorid und anschließend portionsweise 149.2 g (1 Mol) L-Methionin zu. Man läßt die Temperatur nach ca. 2 Std. auf Raumtemperatur steigen, dann wird bei dieser Temperatur 18 Std. weiter gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wird das überschüßige CH_3OH bzw. Thionylchlorid am Rotationsverdampfer bei $60^{\circ}C$ entfernt. Der Rückstand wird in MeOH aufgenommen und mit Ether auskristallisiert.
Ausbeute: 180 g (90 % d. Theorie)

Fp.: 150-152°C (Lit. Fp.: 145-146°C) [92]
$[\alpha]_D^{22}$: +27.0° (c = 0.99, H_2O), Lit. $[\alpha]_D^{22}$: +26.8° [92]
$C_6H_{14}NO_2SCl$ (199.801)

Ber.	C 36.07	H 7.06	N 7.01	S 16.05	Cl 17.74
Gef.	C 35.92	H 7.09	N 6.93	S 16.04	Cl 17.52

6.9.9. N^{α}-[1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl]-L-leucyl-L-tryptophanyl-L-methionin-methylester (Adpoc-Leu-Trp-Met-OCH_3)

1.4 g (2.6 mMol) Adpoc-Leu-Trp-OH, 0.35 ml (2.6 mMol) Chlorameisenisobutylester und 0.29 ml (2.6 mMol) 4-Methylmorpholin werden in 10 ml Dimethylformamid gelöst. Dann wird unter Stickstoffeinleitung auf -30° abgekühlt und ein Gemisch aus 0.6 g (3 mMol) Met-OMe·HCl, 0.5 ml 4-Methylmorpholin, gelöst in 15 ml DMF (auf -30° abgekühlt), zugetropft. Nach einer halben Std. wird das Kühlbad entfernt und das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur erwärmt. Es wird weiter Stickstoff eingeleitet. Nach 24 Std. ist die Umsetzung beendet. Nach Entfernen des 4-Methylmorpholinhydrochlorids wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abrotiert. Der Rückstand wird in Essigester aufgenommen und mit je 20 ml 10 %iger Citronensäure und Na_2CO_3-Lösung 3 mal gewaschen. Anschließend wird mehrmals mit Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Abtrennen des Lösungsmittels wird das Produkt aus Ether/n-Hexan auskristallisiert.

Ausbeute: 1.42 g (80 % d. Theorie)
Fp.: 105-106°C
Rf_D: 0.75 (Methanol/Chloroform/Benzol/Wasser 8:8:8:1)
$[\alpha]_D^{22}$: -15.2° (c = 1, MeOH)
$C_{37}H_{54}N_4O_6S$ (682.839)

Ber.	C 65.08	H 7.97	N 8.20	S 4.69
Gef.	C 65.24	H 8.10	N 7.94	S 3.84

7. Darstellung von L-Tryptophanmethylesterhydrochlorid (L-Trp-OMe·HCl)

L-Tryptophanmethylesterhydrochlorid wird nach Zitat [93] aus L-Tryptophan, Thionylchlorid und Methanol hergestellt.
Ausbeute: 60.93 g (97.6 % d. Theorie)
Fp.: 225-228°C (Lit. Fp.: 216°C [94], Fp.: 213.5-214°C) [93]
$[\alpha]_D^{20}$: +15° (c = 0.4, absol. MeOH)
$[\alpha]_D^{20}$: +17.7 (c = 2.062, MeOH) [93]

$C_{12}H_{15}N_2O_2Cl$ (254.70)	Ber.	C 56.59	H 5.94	N 10.99
	Gef.	C 56.61	H 5.95	N 10.95

7.1. N^{α}-[1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl]-L-leucyl-L-tryptophanmethylester (Adpoc-Leu-Trp-OMe)

8 mMol Adpoc-Leu-OH und 8 mMol H-Trp-OMe·HCl werden in 30 ml DMF gelöst, mit 8 mMol 1-Hydroxybenzotriazol und 1.2 ml 4-Methylmorpholin versetzt und auf -20° gekühlt. Danach werden 1.79 g DCCI, gelöst in wenig DMF (vorgekühlt), zur Reaktionsmischung getropft. Nach Entfernung des Wasserbads, läßt man über Nacht bei Zimmertemperatur rühren.

Nach Beendigung der Umsetzung wird der N,N'-Dicyclohexylharnstoff bei 0°C abfiltriert. Man entfernt das Lösungsmittel im Vakuum und der Rückstand wird in EE gelöst. Man wäscht die EE-Phase 3 mal mit 10 %igem $NaHCO_3$ und mit 10 %iger Citronensäure. Anschließend wird mit Wasser neutral gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Produkt wird aus EE/n-Hexan auskristallisiert.
Ausbeute: 3.16 g (72 % d. Theorie)
Fp.: 158-160°C
Rf_D: 0.85 (Methanol/Chloroform/Benzol/Wasser 8:8:8:1)
$[\alpha]_D^{20}$: -9.2° (c = 2.2, MeOH)

$C_{32}H_{45}N_3O_5$ (551.712) Ber. C 69.67 H 8.22 N 7.61
Gef. C 69.63 H 8.40 N 7.64

7.2. N^{α}-[1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl]-L-leucyl-L-tryptophan (Adpoc-Leu-Trp-OH)

1.66 g (3 mMol) Adpoc-Leu-Trp-OMe werden in 100 ml absol. MeOH gelöst und mit 9.6 ml 1 N NaOH verseift. Nach Beendigung der Reaktion wird das Reaktionsgemisch eingeengt und mit 10 %iger Citronensäure auf pH 4 angesäuert. Das Produkt wird abgesaugt und über P_2O_5 getrocknet.
Ausbeute: 1.58 g (95 % d. Theorie)
Fp.: 185-186°C
Rf_D: 0.51 (Methanol/Chloroform/Benzol/Wasser 8:8:8:1)
$C_{31}H_{43}N_3O_5$ (537.685) Ber. C 69.25 H 8.06 N 7.81
Gef. C 68.61 H 8.39 N 7.94

7.3. N^{α}-[1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl]-L-leucyl-L-tryptophanyl-L-methionin (Adpoc-Leu-Trp-Met-OH)

250 mg (3.66 mMol) Adpoc-Leu-Trp-Met-OMe werden in 100 ml Methanol gelöst. Unter Stickstoff wird der Ester mit 2 ml 2 N NaOH verseift. Die Umsetzung ist nach 18 Std. vollständig. Das Reaktionsgemisch wird eingeengt und mit verdünnter H_3PO_4 auf pH 4.2 angesäuert. Beim Ansäuern fällt das Produkt aus. Man filtriert ab und wäscht mit H_2O. Das Produkt wird über P_2O_5 im Hochvakuum getrocknet.
Ausbeute: 237.5 mg (95 % d. Theorie)
Fp.: 134-136°C
Rf_D: 0.44 (Methanol/Chloroform/Benzol/Wasser 8:8:8:1)
$[\alpha]_D^{20-25}$: -14.8° (c = 1, MeOH)
$C_{36}H_{52}N_4O_6S$ (668.812)
Ber. C 64.65 H 7.84 N 8.73 S 4.78
Gef. C 63.47 H 8.28 N 8.00 S 5.73

Aminosäureanalyse:		Leu	Trp	Met
	Ber.	1.00	1.00	1.00
	Gef.	1.20	1.00	0.70

8. Darstellung von Phenylbenzylkohlensäureester

4.7 g (0.05 Mol) Phenol werden in 20 ml 10 %iger NaOH bei 0°C gelöst. Unter Rühren werden zu dieser Lösung ca. 7 ml Carbobenzoxychlorid (Z-Cl) bei 0 bis -5°C zugetropft. Dann wird die Reaktionsmischung über Nacht bei Zimmertemperatur weitergerührt. Nach Beendigung der Umsetzung trennt man die entstandenen Phasen ab, die wäßrige Phase wird 2 mal mit Ether extrahiert. Die Etherauszüge werden mit dem Öl vereinigt und fraktioniert im Hochvakuum destilliert.
Ausbeute: 9 g (84 % d. Theorie)
farbloses Öl
$Kp_{0.04}$: 103-104°C (Lit. $Kp_{0.1}$: 127-131°C) [95]

8.1. Herstellung von N^{ε}-Carbobenzoxy-L-lysin (H-Lys(Z)-OH)

4.35 g (30 mMol) freies L-Lysin werden in einem Gemisch aus 90 ml Ethanol und 30 ml H_2O gelöst, zum Sieden erhitzt und unter Rühren 6 ml (6.24 g, 30 mMol) Phenylbenzylkohlensäureester, gelöst in 30 ml Ethanol, innerhalb 1 Std. zugetropft (T 78°C). Es wird 15 Min weiter gekocht. Nach dem Stehenlassen über Nacht im Eisschrank kristallisiert das Produkt aus. Man kristallisiert aus warmen Ethanol um.
Ausbeute: 5.17 g (61.5 % d. Theorie)
Fp.: 265-267°C (Lit. Fp.: 238°C (Zers.)) [96]
Fp.: 278-280°C [104] Fp.: ca. 235°C [103]

$[\alpha]_D^{20}$: +16.8° (c = 1, 2 N HCl), Lit. $[\alpha]_D^{20}$: +17.3° (c = 2, 2 N HCl) [103]

$C_{14}H_{20}N_2O_4$ (280.339)	Ber.	C 59.98	H 7.19	N 9.99
	Gef.	C 59.95	H 7.29	N 10.01

8.2. N^{α}-[1-(1-Adamantyl)1-methylethoxycarbonyl]-N^{ε}-carbobenzoxy-L-lysin (Adpoc-Lys(Z)-OH)

5.0 g L-Lys(Z)-OH, 1.89 g Na_2CO_3 und 1.50 g $NaHCO_3$ werden in 35 ml H_2O bei Raumtemperatur gelöst. Danach gibt man 30 ml 1 N NaOH und 40 ml Dioxan zu. Das Gemisch wird auf 0°C gekühlt. Zu dieser Lösung tropft man 6 g Adpoc-F, erwärmt auf Zimmertemperatur und rührt weiter über Nacht. Nach vollständiger Umsetzung wird eingeengt und 3 mal mit Ether extrahiert. Die wäßrige Phase wird mit EE bedeckt und unter Eiskühlung mit verd. H_3PO_4 auf pH 4 angesäuert. Das ölige Produkt wird in EE aufgenommen und mehrmals mit H_2O neutral gewaschen.

Ausbeute: 8.02 g (90 % d. Theorie)

farbloses Öl

Rf_D: 0.56 (Methanol/Chloroform/Benzol/Wasser 8:8:8:1)

$[\alpha]_D^{20-23}$: +8.2° (c = 2, $CHCl_3$)

$C_{28}H_{40}O_6N_2$ (500.628)	Ber.	C 67.18	H 8.05	N 5.59
	Gef.	C 67.66	H 8.73	N 4.78

9. Herstellung von N^{ε}-Boc-Lysin (H-Lys(Boc)-OH)

0.3 Mol L-Lysin werden in 500 ml dest. H_2O gelöst und auf 85-90°C erhitzt. Unter Rühren wird bei dieser Temperatur die Lösung 10 Min lang mit 0.2 Mol $CuCO_3 \cdot Cu(OH)_2 \cdot H_2O$ behandelt. Das Gemisch wird 20 Min lang auf 85-90°C erhitzt

und über Celite heiß filtriert. Der Rückstand wird 4 mal mit H_2O farblos gewaschen. Das vereinigte Filtrat wird auf 20°C abgekühlt, mit 0.3 Mol $NaHCO_3$ und mit H_2O auf 1 l verdünnt. Zu dieser Lösung (L-Lysin-Kupfer-Komplex) wird sofort wieder 0.3 Mol $NaHCO_3$ zugegeben. Unter Rühren werden 0.458 Mol Di-tert-butylcarbonat, in 500 ml Dioxan gelöst, innerhalb 1 Std. zugetropft. Man läßt über Nacht rühren. Es fällt ein Niederschlag aus. Die Suspension wird filtriert, mehrmals mit H_2O und danach 2 mal mit MeOH gewaschen. Der Rückstand wird in 1.5 l MeOH suspendiert und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Man filtriert den Niederschlag ab und wäscht ihn mit kaltem H_2O. Das feuchte Produkt wird in 600 ml H_2O suspendiert und mit dem Dinatriumsalz der Ethylendiamintetraessigsäure (52 g) versetzt. Die Reaktionslösung wird unter Rühren bis zur Auflösung erhitzt. Beim Abkühlen fällt Lys(Boc)-OH aus. Der Niederschlag wird abgesaugt und mit kaltem H_2O mehrmals gewaschen. Das Filtrat wird bei 50°C eingeengt. Das ausgefallene Produkt wird in H_2O gelöst. Unter Eiskühlung werden 300 ml 2 N Ammoniaklösung zugegeben und mit H_2S versetzt (das restliche Kupfer wird entfernt). Nach Abfiltrieren des CuS, wird mehrmals nachgewaschen und aus MeOH/wenig H_2O umkristallisiert.
Ausbeute: 62.59 g (85 % d. Theorie)
Fp.: 257°C (Lit. Fp.: 256-258°C [97], Fp.: 237-255°C [105], Fp.: 238°C [106], Fp.: 235-255°C [107])

9.1. N-[1-(1-Adamanyl)-1-methylethoxycarbonyl]-N^{ε}-Boc-L-lysin (Adpoc-Lys(Boc)OH)

560 mg (2 mMol) H-Lys(Boc)-OH werden in 10 ml H_2O suspendiert und auf +5°C abgekühlt. Unter Rühren werden 3 ml 1 N NaOH und 530 mg (5 mMol) Na_2CO_3 zugegeben (klare Lösung !)

Nach Abkühlung auf 0°C tropft man 960 mg (3.99 mMol) Adpoc-F, gelöst in Dioxan/Ether (4:1), hinzu. Man läßt langsam auf Raumtemperatur erwärmen und gibt nach 1 Std. 3 mMol Triethylamin zu. Nach 18 Std. wird die Reaktionslösung mit Ether extrahiert, die Etherphase 3 mal mit H_2O gewaschen, die vereinigten Wasserphasen mit Citronensäure auf pH 3.5 angesäuert und mit EE (3 mal) extrahiert. Nach Neutralwaschen mit H_2O und Trocknen über Na_2SO_4 wird eingeengt.
Ein Teil wird mit Dicyclohexylamin zu Adpoc-Lys(Boc)·DCHA-Salz umgesetzt.
Ausbeute:
1. Als weißes amorphes Pulver: 810 mg (87 % d. Theorie)
Fp.: 71-75°C
2. Als Adpoc-Lys(Boc)·DCHA-Salz: 920 mg (71 % d. Theorie)
Fp.: 228-229°C
$[\alpha]_D^{21}$: -2.8° ± 0.5° (c = 1, MeOH)

1. $C_{25}H_{42}N_2O_6$ (466.62)

Ber.	C 64.35	H 9.07	N 6.00
Gef.	C 64.01	H 9.39	N 5.87

2. $C_{37}H_{65}N_3O_6$ (647.927)

Ber.	C 68.59	H 10.11	N 6.48
Gef.	C 68.61	H 10.42	N 6.16

9.2. N^{α}-[1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl]-1-L-tryptophan (Adpoc-Trp-OH)

Die Verbindung wird aus L-Trp-OH und Adpoc-F nach Zitat [7] synthetisiert.
Ausbeute: 3.82 g (90 % d. Theorie)
Fp.: 120°C (Lit. Fp.: 116°C) [91]
Rf_D: 0.60 (Methanol/Chloroform/Benzol/Wasser 8:8:8:1)
$[\alpha]_D^{20}$: -6.7° (c = 1, MeOH)

$C_{25}H_{32}N_2O_4$ (424.54)	Ber.	C 70.53	H 7.60	N 6.60
	Gef.	C 71.51	H 8.16	N 6.05

9.2.1. N^{α}-[1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl]-1-L-tryptophan-N-hydroxysuccinimidester (Adpoc-Trp-OSu)

4 g Adpoc-Trp-OH werden mit 1.14 g N-Hydroxysuccinimid in 27 ml Ethylenglycoldimethylether gelöst und auf -30°C abgekühlt. Es werden innerhalb 15 Min 2.04 g DCCI, gelöst in 23 ml Ethylenglycoldimethylether, zugetropft. Danach läßt man bei Raumtemperatur über Nacht rühren. Nach vollständiger Umsetzung wird bei 0°C der Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und zur Trockene einrotiert. Der Rückstand wird in Isopropylalkohol gelöst und durch Zugabe von Petrolether gefällt.

Ausbeute: 3.76 g (77 % d. Theorie)

Fp.: 69°C (Lit. Fp.: 67-69°C) [7]

$[\alpha]_D^{20}$: -8.97° (c = 1.2, MeOH)

$C_{29}H_{35}N_3O_6$ (521.62)	Ber.	C 66.78	H 6.76	N 8.05
	Gef.	C 67.17	H 7.37	N 7.62

9.2.2. N^{α}-[1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl]-1-L-tryptophanyl-N -Boc-Lysin (Adpoc-Trp-Lys(Boc)-OH)

1.0 g (3.56 mMol) H-Lys(Boc)-OH und 524 mg Na_2CO_3 werden in 10 ml H_2O und 5 ml Dioxan gelöst und tropfenweise wird bei 10°C mit 2.5 g (4.7 mMol) Adpoc-Trp-OSu versetzt. Nach vollständiger Umsetzung der Reaktion wird unter Eiskühlung mit verdünnter H_3PO_4 auf pH 4 angesäuert. Man extrahiert das Produkt 4 mal mit Ether, wäscht mit H_2O neutral, und trocknet mit Na_2SO_4. Anschließend wird das Dipeptid auf einer Kieselgelsäule gereinigt. Umkristallisiert wird aus MeOH/H_2O. 2.2 g Produkt werden gewonnen.

Ausbeute: 2.2 g (87 % d. Theorie)
Fp.: 140-141°C (Lit. Fp.: 134°C (Zers.)) [7]
Rf_D: 0.53 (Methanol/Chloroform/Benzol/Wasser 8:8:8:1)
$[\alpha]_D^{23}$: -9.82

$C_{36}H_{52}N_4O_7$ (652.84)	Ber.	C 66.23	H 8.02	N 8.58
	Gef.	C 64.83	H 8.16	N 8.20

9.3. Darstellung von Glycinethylesterhydrochlorid (Gly-OEt·HCl)

400 ml absol. Ethanol werden auf -10°C abgekühlt und mit 15 ml frisch destillierten Thionylchlorid bei -10° bis -5°C versetzt. Anschließend gibt man 7.51 g (0.1 Mol) Glycin zu. Man läßt die Temperatur auf Zimmertemperatur innerhalb 2 Std. steigen und rührt 18 Std. bei dieser Temperatur weiter. Zum Schluß wird auf 60°C erhitzt (1 Std.). Nach Beendigung der Reaktion wird das überschüßige Ethanol bzw. Thionylchlorid abgedampft. Das Produkt kristallisiert nadelförmig aus. Es wird 3 mal mit Ether gewaschen und über NaOH getrocknet.
Ausbeute: 12.94 g (92 % d. Theorie)
Fp.: 141-142°C (1. Umkristallisation)
Fp.: 142-143°C (2. Umkristallisation) (Lit. Fp.: Öl) [98]

$C_4H_{10}NO_2Cl$ (139.624)	Ber.	C 34.41	H 7.22	N 10.03
	Gef.	C 35.67	H 7.46	N 10.35

9.3.1. Adpoc-Gly-OEt

1.0 g H-Gly-OEt·HCl werden in 100 ml Ethanol gelöst und mit 1.1 ml Triethylamin versetzt. Nach Zugabe von Ether und Abkühlung auf -20°C, fällt das Triethylammoniumchlorid aus. Dies wird abgetrennt und mit Ether nachgewaschen. Die Lösung wird eingeengt. Durch Zugabe von 60 ml DMF wird der Glycinethylester gelöst. Zu dieser Lösung fügt man

4 ml Triethylamin zu und bei -10°C werden 3.10 g Adpoc-F, gelöst in 10 ml DMF/Ether (4:1), zugetropft. Nach 2 Std. ist die Reaktion beendet. Bei der Abkühlung fällt das Ammoniumhydrochlorid aus. Man entfernt dieses Ammoniumsalz und engt das Filtrat ein. Nach Befreiung von DMF, wird der Rückstand in EE aufgenommen und mit 10 %igem $NaHCO_3$ bzw. H_2O neutral gewaschen. Das Produkt wird aus Ether/Hexan umkristallisiert.

Ausbeute: 2.04 g (88 % d. Theorie)

Fp.: 89-90°C

Rf_D: 0.76 (Methanol/Chloroform/Benzol/Wasser 8:8:8:1)

$C_{18}H_{29}NO_4$ (323.43)	Ber.	C 66.84	H 9.04	N 4.33
	Gef.	C 67.52	H 9.22	N 4.38

9.4. Darstellung von Adpoc-Leu-Pro-OMe

21.08 g (60 mMol) Adpoc-Leu-OH, 9.97 g (60 mMol) Pro-OMe·HCl, 8.09 g (60 mMol) HOBt und 6.6 ml (60.3 mMol) N-Methylmorpholin werden in 150 ml DMF/CH_2Cl_2 (3:1) gelöst und auf -10°C abgekühlt. Es wird dann eine vorgekühlte Lösung von 70 mMol DCCI, gelöst in wenig DMF, zugetropft. Man rührt 1 Std. bei -10°C und 11 Std. bei Raumtemperatur. Nach vollständiger Umsetzung wird der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff bei 0°C abgetrennt und das Filtrat eingeengt. Man löst den Rückstand in EE und wäscht 3 mal mit 10 %iger Citronensäure, 2 mal mit H_2O, 3 mal mit 10 %iger Na_2CO_3-Lösung und anschließend mit H_2O neutral. Nach Trockenen über Na_2SO_4 wird im Rotationsverdampfer eingeengt, mit Ether versetzt und mit n-Hexan gefällt.

Ausbeute: 26.37 g (95 % d. Theorie)

Fp.: 144°C

$[\alpha]_D^{20-25}$: -50.0° (c = 1, MeOH)

$C_{26}H_{42}N_2O_5$ (462.63)	Ber.	C 67.50	H 9.15	N 6.06
	Gef.	C 67.30	H 9.06	N 6.13

9.5. Darstellung von Adpoc-Pro-OH

2.3 g (20 mMol) L-Prolin, 20 mMol $NaHCO_3$ und 20 mMol Na_2CO_3 werden in 40 ml H_2O/30 ml Dioxan gelöst und auf 0°C abgekühlt. Man fügt unter Rühren eine Lösung von 30 mMol Adpoc-F (8.2 g), gelöst in 20 ml Dioxan, zu. Man rührt 2 Std. bei 0°C und läßt die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmen. Anschließend läßt man über Nacht rühren. Nach Beendigung der Reaktion (DC-Kontrolle) wird das Dioxan weitgehend im Vakuum abgedampft und nach 3 maliger Extraktion mit Ether (Etherphase verwerfen!) unter Eiskühlung wird mit Essigester überschichtet. Man säuert mit verdünnter H_3PO_4 auf pH 3 an. Nach Trennung der Phasen wird die wäßrige Phase noch 2 mal mit EE ausgeschüttelt. Die vereinigten EE-Phasen werden mit H_2O gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Produkt wird aus Petrolether umkristallisiert.

Ausbeute: 5.23 g (78 % d. Theorie)

Fp.: 130-131°C

$[\alpha]_D^{20-25}$: -28.6° (c = 1, MeOH)

$C_{19}H_{29}NO_4$ (335.44)	Ber.	C 68.03	H 8.71	N 4.17
	Gef.	C 68.18	H 8.84	N 4.09

Razemattest: 0.034 % D-Pro

9.6. Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Bestimmung der Abspaltungskinetik

Methode a

5 bis 20 µMol der geschützten Aminosäure oder des Peptids werden mit 2 ml Abspaltungsreagenz unter starkem Rühren bei 24°C versetzt. Nach bestimmten Zeitabschnitten (10, 20, 30 sec usw.) werden jeweils 20 µl Reaktionsgemisch entnommen und durch Einbringen in ein 200 µl Methanol und 100 µl 10 %ige NH_3-Lösung enthaltendes Reaktionsgefäß wird

die Abspaltung gestoppt. Nach dem Abstoppen ist der pH-Wert stets 11. Die Lösung wird im Exsikator über P_2O_5 abgedampft. Der Rückstand wird in 50 µl der mobilen Phase (HPLC-Trennsystem) gelöst. Dann werden 1 oder 5 µl jeder Probe in das HPLC-Gerät injiziert und 2 µl auf DC-Platten getüpfelt. Die DC-Platte wird im System Chloroform/Methanol/Benzol/Wasser (8:8:8:1) entwickelt und nach dem Trocknen wird mit UV-Licht, Ninhydrinlösung oder Chlor-Tolidin detektiert.

Methode b

Die Abspaltung mit 50 % HCOOH/TFEt/$CHCl_3$ (1:9:1) (v/v) erfolgt wie bei Methode (a), nur wird die Reaktion nicht abgestoppt. Es werden nach bestimmten Zeitabständen jeweils 5 µl Reaktionsgemisch in das HPLC-Gerät direkt injiziert. Zugleich werden 2 µl Reaktionslösung für die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen verwendet.

10. ZUSAMMENFASSUNG

Die Synthesen neuer Adpoc-geschützter Aminosäuren und Peptiden werden beschrieben. ^{13}C-NMR-Spektroskopie und Felddesorptions-Massenspektrometrie dienen zur Charakterisierung der Verbindungen.

Die Adpoc-geschützten Aminosäuren und Modellpeptide werden mit verschiedenen Abspaltungsreagenzien mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und Dünnschichtchromatographie auf ihr Abspaltungsverhalten bezüglich Selektivität und Bildung von Nebenprodukten bei Raumtemperatur untersucht. Es wurden zwei Abspaltungsreagenzen gefunden, die die Adpoc-Gruppe relativ schnell, selektiv und mit möglichst wenig Nebenprodukten abspalten.

Die selektive Abspaltung der Adpoc-Gruppe in Gegenwart einer N^{ε}-Boc-Gruppe wurde am Beispiel von Adpoc-Trp-Lys(Boc)-OH mit 0.1 N Salzsäure/Trifluorethanol/Chloroform (1:9:1) (v/v) und mit 50 % Ameisensäure/Trifluorethanol/Chloroform (1:9:1) (v/v) bei Raumtemperatur nachgewiesen. Eine vollständige Abspaltung der Adpoc-Gruppe von Adpoc-Trp-Lys(Boc)-OH gelingt mittels 0.1 N Salzsäure/Trifluorethanol/Chloroform (1:9:1) nach 57.5 Minuten. Dabei wird die Boc-Gruppe nicht abgespalten und der Indolring des Tryptophans bleibt stabil. Man stellt fest, daß nach 13 Stunden Reaktionszeit ca. 3.5 bis 5 % der Boc-Gruppe abgespalten werden. Eine weitere Verfolgung der Reaktion zeigt, daß nach 6, 10, 15 Tagen 70 %, 92 %, 99 % der Boc-Gruppe abgespalten werden. Die Untersuchungen mit 50 % Ameisensäure/Trifluorethanol/Chloroform (1:9:1) (v/v) zeigen, daß eine noch höhere Selektivität der Abspaltung der Adpoc-Gruppe von Adpoc-Trp-Lys(Boc)-OH, ohne Entstehung von Nebenprodukten, erreicht wird. Es wird mittels HPLC- und Dünnschichtchromatographie nachgewiesen, daß

die Boc-Gruppe bis zu 27 Stunden Reaktionszeit intakt bleibt. Erst nach 2 Tagen wird ein geringer Teil der Boc-Gruppe abgespalten.

Weiterhin wird die selektive Abspaltung der Adpoc-Gruppe in Anwesenheit einer N^{ε}-Z-, -O-Benzyl- oder Methylgruppe mit den oben genannten Abspaltungsreagenzien untersucht. Die Abspaltung der Adpoc-Gruppe dieser Verbindungen gelingt mit 0.1 N Salzsäure/Trifluorethanol/Chloroform (1:9:1) innerhalb von 15 bis 32 Minuten. Dabei werden die Benzylgruppe des Tyrosins und die N^{ε}-Z-Gruppe des Lysins nicht abgespalten.

Aus den ermittelten Geschwindigkeitskonstanten der Adpoc-geschützten Aminosäuren, wird festgestellt, daß die Spaltungsgeschwindigkeit der Adpoc-Gruppe von der Seitenkette der Aminosäurekomponente, und vom Reaktionsmedium abhängt.

11. LITERATURVERZEICHNIS

[1] E. Wünsch, Synthese von Peptiden, in: Houben-Weyl-Müller, Methoden der Organischen Chemie, Vol. XV/1, Thieme, Stuttgart 1974

[2] P. Sieber und B. Iselin, Helv. Chim. Acta 51, 622 (1968)

[3] C. Birr, Liebigs Ann. Chem. 763, 162 (1972)

[4] P. Sieber und B. Iselin, Helv. Chim. Acta 51, 614 (1968)

[5] A.T. Kyi und R. Schwyzer, Helv. Chim. Acta 54, 1642 (1976)

[6] H. Kalbacher und W. Voelter, Angew. Chem. 90, 998 (1978); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 17, 944 (1978)

[7] H. Kalbacher, Dissertation, Universität Tübingen 1980

[8] W. Voelter und J. Müller, Lieb. Ann. Chem. (1983), 248

[9] J. Müller und W. Voelter, in: Biologically Active Principles of Natural Products, p. 176, W. Voelter, D.G. Daves (eds.), Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1983

[10] W. Voelter und H. Kalbacher, in: Peptides, Structure and Biological Function, p. 325, E. Gross, J. Meienhofer (eds.), Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois, 1979

[11] H. Kalbacher und W. Voelter, in: Structure and Activity of Natural Peptides, p. 383, W. Voelter, G. Weitzel (eds.), Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1981

[12] H. Wollmann, Dissertation, Universität Tübingen 1983

[13] G.Rampold, E. Lundanes, K. Folkers, W. Voelter, H. Kalbacher und E. Bliznakow, Z. Naturforsch. 35b, 1476 (1980)

[14] K. Folkers, et al., Research on Thymic Peptides and Immunocompetence in: Structure and Activity of Natural Peptides, p. 59, W. Voelter, G. Weitzel (eds.), Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1981

[15] W. Heinzel, T. Kronbach und W. Voelter, Z. Naturforsch. 37b, 1652 (1982)

[16] R. Hirschmann, D.F. Veber, in: The Chemistry of Polypeptides, Assays in Honor of Leonidas Zervas, G. Katsoyannis, Herausg., Plenum Press, N.Y., S. 125 (1973)

[17] K. Lübke und H. Klostermayer, Adv. Enzymology 33, 445 (1970)

[18] E. Wünsch, Angew. Chem. 83, 773 (1971)

[19] Houben-Weyl, Methoden der org. Chemie, Vol. 15, 4. Aufl. Synthese von Peptiden I, E. Wünsch (Herausg.), Thieme Verlag, Stuttgart, 1972

[20] H. Zimmermannova, et al. in: Peptides, Proc. 6th Europ. Peptide Symposium, Oxford 1962, Pergamon Press Ltd. Oxford (1966) p. 21

[21] J. Pless, et al., Helv. Chim Acta 45, 394 (1962)

[22] C.A. Dekker, S.P. Taylor und J.S. Fruton, J. Biol. Chem. 180, 155 (1949)

[23] S. Bajusz und K. Medzihradszky, in: Peptides, Proc. 5th Europ. Peptide Symposium Oxford, 1962, Pergamon Press Ltd. Oxford (1963) p. 49

[24] S. Sakakibara und Y. Shinonishi, Bull. Chem. Soc. Japan 38, 1412 (1965)

[25] R.B. Merrifield, et al., in: Peptides, Proc. 5th Amer. Peptide Symposium, M. Goodman and J. Meienhofer (eds.), John Wiley and Sons, N.Y. (1977), p. 488

[26] E. Schaich, et al., Hoppe Seyler's Z. 354, 897 (1973)

[27] D. Yamashiro und C.H. Li, Int. J. Peptide Protein Res. 4, 181 (1972)

[28] V.T. Ivanov, et al., in: Peptides 1976, Proc. 14th Europ. Peptide Symposiu, Wepion, Belgien, A. Loffet (Herausg.) (1976), p. 219

[29] F.C. McKay und N.F. Albertson, J. Amer. Chem. Soc. 79, 4686 (1957)

[30] F. Weygand und K. Hunger, Chem. Ber. 95, 1 (1962)

[31] B.W. Erickson und R.B. Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 95, 3750 (1973)

[32] C.C. Yang und R.B. Merrifield, J. Org. Chem. 41, 1032 (1976)

[33] D. Yamashiro und C.H. Li, J. Org. Chem. 38, 2594 (1973)

[34] R.S. Feinberg und R.B. Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 97, 3485 (1975)

[35] D.C. Chang und J. Meienhofer, Int. J. Peptide Protein Res. 11, 246 (1978)

[36] D.L. Schaffer, et al., Ind. Eng. Chem. Process Des. Develop. 13, 14 (1974)

[37] E. Wünsch, E. Jaeger, L. Kisfaludy und M. Löw, Angew. Chem. 89, 330 (1977)

[38] E. Wünsch, E. Jaeger, P. Thamm, S. Knof, M. Löw und L. Kisfaludy, Hoppe-Seyler's Z. 359, 1617 (1978)

[39] E. Jaeger, P. Thamm, S. Knof und E. Wünsch, ibid 359, 1629 (1978)

[40] M. Löw, L. Kisfaludy und P. Sohar, Hoppe-Seyler's Z. 359, 1643 (1978)

[41] R.L. Noble, D. Yamashino und C.H. Li, J. Amer. Chem. Soc. 98, 2324 (1976)

[42] Y.B. Alakhov, A.A. Kiryushkin und V.M. Lipkin, J.C.S. Chem. Comm. (1970), 406

[43] B.F. Lund, N.L. Johansen, A. Volund und J. Markussen, Int. J. Peptide Protein Res. 12, 258 (1978)

[44] J.J. Sharp, A.B. Robinson und M.D. Kamen, J. Amer. Chem. Soc. 95, 6097 (1973)

[45] M. Löw, L. Kisfaludy und P. Sohar, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 1643 (1978)

[46] J.P. Tam, W.F. Heath und R.B. Merrifield, Int. J. Peptide Protein Res. 21, 57 (1983)

[47] P. Sieber und B. Iselin, Helv. Chim. Acta 52, 1525 (1969)

[48] B. Riniker, B. Kamber und P. Sieber, Helv. Chim. Acta 58, 1086 (1975)

[49] K. Blaha und J. Rudinger, Coll. Czech. Chem. Comm. 30, 585 (1965)

[50] G. Losse, D. Zeidler und T. Grieshaber, Liebigs Ann. Chem. 715, 196 (1968)

[51] E. Breitmaier und W. Voelter, ^{13}C-NMR-Spektroskopie, 2. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim, 1978

[52] E. Breitmaier und G. Bauer, ^{13}C-NMR-Spektroskopie, Georg-Thieme Verlag, Stuttgart 1977

[53] W. König und R. Geiger, Chem. Ber. 103, 788 (1970)

[54] Y.S. Klausner und M. Bodanszky, Synthesis 453 (1972)

[55] N.L. Benoiton, K. Kuroda und F.M.F. Chen, Int. J. Peptide Protein Res. 13, 403 (1979)

[56] F. Weygand, D. Hoffmann und E. Wünsch, Z. Naturforsch. 21b, 426 (1966)

[57] E. Wünsch und F. Drees, Chem. Ber. 99, 110 (1966)

[58] M. Goodman, P. Keogh und H. Anderson, Bioorg. Chem. 6, 239 (1977)

[59] J. Honzl und J. Rudinger, Collect. Chem. Commun. 26, 2333 (1961)

[60] Persönliche Mitteilung der Fa. Bachem Feinchemikalien AG, Bubendorf/Schweiz

[61] W.S. Hancock, C.A. Bishop, D.R.K. Harding und L.J. Meyer, Science 200, 1168 (1978)

[62] E. Lundanes und T. Greibrokk, J. Chromatogr. 149, 241 (1978)

[63] S. Terabe, R. Konaka und K. Inonye, J. Chromatogr. 172, 163 (1979)

[64] J.E. Rivier, J. Liquid Chromatogr. 1, 343 (1978)

[65] M.J. O'Hare und E.C. Nice, J. Chromatogr. 171, 209 (1979)

[66] J. Rivier, R. Kaiser und R. Galyean, Biopolymers 17, 1927 (1978)

[67] C. Nice und M.J. O'Hare, J. Chromatogr. 162, 401 (1979)

[68] M.T.W. Hearn, et al., J. Liquid Chromatogr. 2, 1 (1979)

[69] U. Pechanek, G. Blaicher, W. Pfannhauser und H. Woidich, Chrom. 13, Nr. 7, 421 (July 1980)

[70] R. Schuster, Anal. Chem. 52, 617 (1980)

[71] J.P. Tischio und N. Hetyei, J. of Chrom. 236, 237 (1982)

[72] K.-K. Wahlund und B. Edlen, J. of Liquid Chrom. 4, Nr. 2, 309 (1981)

[73] V.J. Schiner, Jr., W. Dowd, R.D. Fischer, S.R. Hartshorn, M.A. Kessick, L. Milakofsky und M.W. Rapp, J. Amer. Chem. Soc. 91, (17) 4838 (1969)

[74] T. Schiba und K. Nunami, Tetrahedron Letters 1974, 509

[75] K. Takahashi, M. Tadenuma, K. Kitamoto und S. Sato, Agric. biol. Chem. 38, 927 (1974)

[76] G.W. Anderson, J.E. Zimmermann und F.M. Callahan, J. Amer. Chem. Soc. 89, 5012 (1967)

[77] J.P. Redfern und A.W. Coats, Nature 20, 68 (1964)

[78] G.W.C. Hung, Thermochimica Acta 23, 233 (1978)

[79] P.G. Olafsson und A.M. Bryan, Geochimica et Coscmochimica Acta 35, 327 (1971), Pergamon Press, Printed in Northern Ireland

[80] P.G. Olafsson und A.M. Gryan, J. of Thermal Analysis 11, 359 (1977)

[81] H. Anderson, E. Witte und D. Haberland, Z. Phys. Chem. Leipzig 264, 409 (1983)

[82] Homer E. Kissinger, Analytical Chem. 29, Nr. 11 (1957)

[83] J.A. Riddick und W.B. Bunger, Organic Solvents, Physical Properties and Methods of Purification, New York 1970

[84] L.A. Carpino, C.A. Giza und B.A. Carpino, J. Amer. Chem. Soc. 81, 955 (1957)

[85] J.B. Greenstein und M. Winitz, in: Chemistry of the Amino Acids, J. Wiley and Sons, New York, 1961

[86] V. Meyer, Praxis der HPLC, Verlag Moritz Diesterweg, Otto Salle Verlag, Frankfurt/M., Berlin, München

[87] W. van Hartins, P.E. Verkade und B.M. Wepster, Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 75, 349 (1956)

[88] G. Siegmund, Angew. Chem. 85, 982 (1973)

[89] L. Wackerle und I. Ugi, Synthesis (1975), 598

[90] H. Kalbacher und W. Voelter, J.C.S. Chem. Comm. (1980), 1265

[91] W. Fuchs, H. Kalbacher und W. Voelter, Organic Magnetic Resonance 17, Nr. 3, 157 (1981)

[92] H. Yajima, K. Kawasaki, Y. Kinomura, T. Oshima, S. Kimoto und M. Okamoto, Chem. Pharm. Bull. Japan 16, 1342 (1968)

[93] H. Peter, M. Brugger, J. Schreiber und A. Eschenmosser, Helv. Chim. Acta 46, 577 81963)

[94] R.A. Boissonnas und et al., Helv. Chim Acta 41, 1867 (1958)

[95] H. Zahn und F. Schmidt, Makromol. Chem. 36, 1 (1960)

[96] H. Zahn und H.R. Falkenburg, Ann. Chem. 636, 117 (1960)

[97] J.W. Scott, D. Parker und D.R. Parrish, Syn. Comm. 11, (4), 303 (1981)

[98] M. Goodman und W.J. McGahren, Tetrahedron 23, 2031 (1967)

[99] A.R. Fahmy, A. Niederwieser, G. Pataki und M. Brenner, Helv. Chim. Acta 44, 2022 (1961)

[100] Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papierchromatographie, Firmenschrift der Fa. Merck, Darmstadt

[101] F. Reindel und W. Hoppe, Chem. Ber. 87, 1103 (1954)

[102] H. Kalbacher und W. Voelter, Z. Physiol. Chem. 360, 1161 (1979)

[103] A.A. Costopanagiotis, B.O. Handford und B. Weinstein, J. of Org. Chem. 33, 1261 (1968)

[104] R. Ledger und F.H.C. Stewart, Aust. J. Chem. 18, 933 (1965)

[105] R. Schwyzer und W. Rittel, Helv. Chim. Acta 44, 159 (1961)

[106] L. Zervas und C. Hamalidis, J. Amer. Chem. Soc. 87, 99 (1965)

[107] I. Barrat und J. Savrda, Synthesis (1973), 759

LEBENSLAUF

Ich, Charles Tuosie Beni, Sohn von Beni Chemogoh und Baabereyir Beni Chemogoh, wurde am 31.12.1950 in Nandom/Ghana geboren.

1957 - 1963 besuchte ich die Nandom Local Authority Primärschule in Nandom. Danach ging ich zwei Jahre zur Mittelschule (Local Authority Middle School/Nandom). Ab September 1965 besuchte ich die Government Sekundärschule in Tamale. 1970 nahm ich an dem Staatsexamen für das General Certificate of Education (G.C.E.) Oridinary Level teil. Nach diesem Examen wurde ich zum Abitur (G.C.E. - Advanced Level) an der gleichen Schule zugelassen. 1972 legte ich das Abitur in Mathematik, Physik, Chemie und Allgemeinwissenschaften ab.

Mitte 1975 bis Juli 1980 studierte ich Verfahrenschemie an der Technischen Hochschule Merseburg, Juli 1980 absolvierte ich das Diplom in Verfahrenschemie.

Von September 1981 bis Januar 1985 entstand die vorliegende Arbeit unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. Wolfgang Voelter in der Abteilung für Physikalische Biochemie am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen.